

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Translocación del Peptidil-tRNA correcta e incorrectamente
codificado : efecto de la viomicina y de los antibióticos
aminoglicosídicos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Jesús Cabañas Arenzana

Madrid, 2015

TS77.18
CAB
Hra



Autor: M^a Jesús CABAÑAS ARENZANA

TRANSLOCACION DEL PEPTIDIL-trNA CORRECTA E INCORRECTA-
MENTE CODIFICADO. EFECTO DE LA VIOMICINA Y DE LOS AN-
TIBIOTICOS AMINOGLICOSIDICOS.

Director: Juan MODOLELL MAINOU

Dr. en Ciencias Químicas y Bioquímicas

Investigador científico del CSIC.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Bioquímica

Año 1980



R 23.076



TRANSLOCACION DEL PEPTIDIL-trNA CORRECTA E INCORRECTA-
MENTE CODIFICADO. EFECTO DE LA VIOMICINA Y DE LOS AN-
TIBIOTICOS AMINOGLICOSIDICOS.

TESIS que, para optar al grado de DOCTOR
en CIENCIAS por la Universidad Complutense
de Madrid, presenta:

M^a Jesús Cabañas Arenzana
Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma, Madrid.

Febrero de 1980.

Mi agradecimiento al Dr. Juan Modolell, por la dirección de esta Tesis, al Prof. David Vázquez, por haberme permitido realizarla en su grupo de investigación y al Prof. Angel Martín Municio por ser el Ponente de la misma.

Quiero dar las gracias, también, a todos los que, de una forma u otra, han contribuido a que este trabajo sea realidad; particularmente a mis compañeros de Departamento y, muy especialmente, a Pilar Ochoa por su excelente asistencia técnica.

INDICE

ABREVIATURAS

Pág.

1

CAPITULO I: INTRODUCCION

| | | |
|------------|---|----|
| I.1. | Biosíntesis de proteínas | 4 |
| I.1.1. | Activación de los aminoácidos | 4 |
| I.1.2. | Iniciación de la cadena polipeptídica | 5 |
| I.1.3. | Polimerización de la cadena polipeptídica | 8 |
| I.1.3.1. | Fijación del aminoacil-tRNA | 8 |
| I.1.3.2. | Formación del enlace peptídico | 10 |
| I.1.3.3. | Translocación | 12 |
| I.1.3.3.1. | Hidrólisis de GTP asociada a la translocación | 14 |
| I.1.3.3.2. | Interacción del EF-G con el ribosoma, desacopla- da de la translocación | 15 |
| I.1.4. | Terminación de la cadena peptídica | 16 |
| I.1.5. | Estructura del ribosoma | 17 |
| I.1.6. | Relación entre estructura y función del ribosoma | 21 |
| I.2. | Inhibidores específicos de la síntesis de pro- teínas | 21 |
| I.2.1. | Antibióticos aminoglicosídicos | 22 |
| I.2.1.1. | La estreptomicina y antibióticos relacionados | 27 |
| I.2.1.2. | Antibióticos aminoglicosídicos que contienen un residuo de 2-deoxiestreptamina | 29 |
| I.2.2. | La viomicina | 33 |
| I.3. | Planteamiento de nuestro trabajo | 34 |

CAPITULO II: MATERIALES

| | | |
|-----------|---|----|
| II.1. | Células | 37 |
| II.1.1. | Crecimiento celular | 37 |
| II.1.2. | Recogida y lavado de las células | 38 |
| II.2. | Ribosomas y fracciones solubles | 38 |
| II.2.1. | Rotura de las células | 38 |
| II.2.2. | Obtención de la fracción S100 | 39 |
| II.2.2.1. | Purificación parcial de la fracción S100 para carga de tRNA | 40 |
| II.2.3. | Ribosomas | 41 |
| II.3. | Aislamiento de polisomas endógenos | 42 |
| II.4. | Factores de polimerización | 44 |
| II.4.1. | Preparación de los factores EF-T y EF-G | 44 |
| II.4.2. | Electroforesis preparativa | 47 |
| II.4.3. | Ensayo de actividad de los factores de polimeri- zación | 48 |
| II.5. | Preparación de aminoacil-tRNAs | 49 |
| II.5.1. | Preparación de Phe-tRNA | 50 |
| II.5.2. | Preparación de Phe-tRNA ^{Phe} y Tyr-tRNA ^{Tyr} | 51 |
| II.5.3. | Acetilación de Phe-tRNA ^{Phe} y Tyr-tRNA ^{Tyr} | 52 |
| II.6. | Otros materiales | 52 |
| II.6.1. | Preparación y purificación de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ | 52 |
| II.6.2. | Líquidos de centelleo | 53 |
| II.6.3. | Preparación de resinas para cromatografía en co- lumna | 53 |
| II.6.4. | Procedencia de los productos químicos y bioquími- cos | 54 |

CAPITULO III: METODOS ANALITICOS

| | | |
|------------|---|----|
| III.1. | Fijación de aminoacil-tRNAs a ribosomas | 59 |
| III.1.1. | Técnica analítica | 59 |
| III.1.2. | Fijación enzimática de Phe-tRNA | 59 |
| III.1.3. | Fijación enzimática de Phe-tRNA ^{Phe} | 60 |
| III.1.4. | Fijación enzimática de Tyr-tRNA ^{Tyr} | 60 |
| III.1.5. | Fijación no enzimática de AcPhe-tRNA ^{Phe} | 61 |
| III.1.5.1. | Fijación de AcPhe-tRNA ^{Phe} al sitio A | 61 |
| III.1.5.2. | Fijación de AcPhe-tRNA ^{Phe} al sitio P | 62 |
| III.1.6. | Purificación del complejo ribosoma·poli(U)· ·AcPhe-tRNA | 62 |
| III.2. | Translocación | 63 |
| III.2.1. | Técnica analítica | 63 |
| III.2.2. | Translocación enzimática de AcPhe-tRNA | 64 |
| III.2.3. | Translocación del peptidil-tRNA en polisomas | 65 |
| III.3. | Síntesis polipeptídica | 65 |
| III.3.1. | Síntesis de polifenilalanina | 66 |
| III.3.2. | Síntesis no enzimática de polifenilalanina | 67 |
| III.3.3. | Síntesis de proteínas en polisomas endógenos | 68 |
| III.4. | Determinación de la posición de cadenas poli- peptídicas nacientes | 69 |
| III.4.1. | Bloqueo de la síntesis de proteínas en polisomas endógenos | 69 |
| III.4.2. | Bloqueo de la síntesis de polifenilalanina en ribosomas | 70 |
| III.5. | Síntesis de AcPhe-(aa) _{n≥1} -tRNA. Análisis de los productos sintetizados por electroforesis de alto | |

| | | |
|-------------------------------------|---|------------|
| | voltaje | Pág. 71 |
| III.6. | Ensayo de peptidil-transferasa | 73 |
| III.7. | Hidrólisis de GTP dependiente de EF-G y ribosomas | 74 |
| III.8. | Formación del complejo GDP·EF-G·ribosoma·ácido fusídico | 75 |
| III.9. | Intercambio de GDP en el complejo cuaternario | 76 |
| III.10. | Desprendimiento del AcPhe-tRNA fijado en el sitio ribosómico A | 76 |
| CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSION | | |
| IV.1. | Efecto de la higromicina B en la síntesis de proteínas. Modo de acción | 78 |
| IV.1.1. | Introducción | 78 |
| IV.1.2. | Sensibilidad de la polimerización de la cadena polipeptídica a la higromicina B | 79 |
| IV.1.2.1. | Sistema de síntesis polipeptídica dirigido por RNA mensajero natural | 79 |
| IV.1.2.2. | Síntesis de polifenilalanina dirigida por ácido poliuridílico | 81 |
| IV.1.3. | Efecto de la higromicina B en la fijación enzimática de [³ H]Phe-tRNA | 86 |
| IV.1.4. | Ausencia de efecto de la higromicina B sobre la peptidil-transferasa | 88 |
| IV.1.5. | Inhibición por la higromicina B de la translocación enzimática | 88 |
| IV.1.5.1. | Translocación enzimática de AcPhe-tRNA | 88 |

| | Pág. |
|-----------|---|
| IV.1.5.2. | Translocación enzimática del peptidil-tRNA en polisomas 90 |
| IV.1.5.3. | Posición de las cadenas polipeptídicas nacientes en sistemas de síntesis bloqueados por la higromicina B 94 |
| IV.1.6. | Mecanismo de la inhibición de la translocación ribosómica por la higromicina B 101 |
| IV.1.6.1. | Efecto de la higromicina B en la síntesis no enzimática de polifenilalanina 101 |
| IV.1.6.2. | Ausencia de efecto de la concentración de EF-G en la inhibición de la translocación por el antibiótico 102 |
| IV.1.6.3. | Carencia de efecto de la higromicina B en la interacción del EF-G con el ribosoma 105 |
| IV.1.6.4. | Acción de la higromicina B en el movimiento del peptidil-tRNA 107 |
| IV.1.7. | Discusión 112 |
| IV.2. | Efecto de los antibióticos aminoglicosídicos en el ciclo de polimerización de las cadenas peptídicas 116 |
| IV.2.1. | Introducción 116 |
| IV.2.2. | Efecto de varios antibióticos aminoglicosídicos en la fijación enzimática del Phe-tRNA 116 |
| IV.2.3. | Inhibición por los antibióticos aminoglicosídicos de la translocación enzimática 120 |
| IV.2.4. | Carencia de efecto de los antibióticos aminoglicosídicos sobre la peptidil-transferasa 123 |

| | Pág. |
|-----------|--|
| IV.2.5. | Efecto de los antibióticos aminoglicosídicos en la polimerización de las cadenas nacientes en polisomas 124 |
| IV.2.6. | Discusión 133 |
| IV.3. | Incorporación en cadenas peptídicas del Tyr-tRNA ^{Tyr} , fijado a ribosomas programados con poli(U) 138 |
| IV.3.1. | Introducción 138 |
| IV.3.2. | La fijación del Tyr-tRNA ^{Tyr} tiene lugar en el sitio aceptor del ribosoma 139 |
| IV.3.3. | Translocación espontánea del peptidil-tRNA erroneamente codificado 143 |
| IV.3.4. | Desprendimiento espontáneo del peptidil-tRNA erroneamente codificado del ribosoma 148 |
| IV.3.5. | Efecto de la viomicina y otros antibióticos en el desprendimiento espontáneo y en la translocación no enzimática del peptidil-tRNA erroneamente codificado 155 |
| IV.3.5.1. | Polimerización promovida por EF-G del peptidil-tRNA erroneamente codificado, en presencia de la viomicina 159 |
| IV.3.5.2. | Efecto de la viomicina en la translocación del dipeptidil-tRNA correcta y erroneamente codificado 163 |
| IV.3.6. | Discusión 166 |

| | |
|--------------|------|
| | Pág. |
| CONCLUSIONES | 172 |
| BIBLIOGRAFIA | 175 |

A B R E V I A T U R A S

| | |
|------------------|---|
| A ₂₆₀ | Unidad de absorbancia a 260 nm; es la cantidad de material que, disuelto en 1 ml de agua, tiene una absorción de 1 cuando se mide en una cubeta de 1 cm de paso de luz. |
| aa | Aminoácido, aminoacil- |
| AcPhe-tRNA | Acetil fenialanil-tRNA |
| AcTyr-tRNA | Acetil tirosinil-tRNA |
| ATP | Adenosín- 5' trifosfato |
| AUG | Codón de iniciación de la cadena peptídica |
| BSA | Seroalbúmina bovina |
| Butil-PBD | 2-(4' terc-butilfenil)-5(4'' difenil)1,3,4oxidiazol |
| 0°C | Grados centígrados |
| cpm | Cuentas por minuto |
| CTP | Citidin-5' trifosfato |
| 50S | Subunidad ribosómica mayor en Procariontes |
| DEAE-celulosa | Dietilaminoetil-celulosa |
| DEAE-Sephadex | Dietilaminoetil-Sephadex |
| DNasa | Desoxirribonucleasa |
| DTT | Ditiotreitol |
| E | Coeficiente de extinción. Absorbancia de una solución de concentración unidad, a una determinada longitud de onda. |
| <u>E. coli</u> | <u>Escherichia coli</u> |
| EDTA | Acido etilen-diaminotetraacético |
| EF-G | Factor de polimerización G |
| EF-Ts | Factor de polimerización Ts |

| | |
|-------------------------|--|
| EF-Tu | Factor de polimerización Tu |
| EF-T | Fracción que contiene los factores EF-Tu y EF-Ts. |
| f-met-tRNA _f | Formil metionil-tRNA |
| xg | Unidad relativa de campo centrífugo en el centro del tubo de centrifugación. Representa la aceleración de la gravedad. |
| GDP | Guanosín-5' difosfato |
| GppCH ₂ p | Guanosín-5'-il metilen difosfonato |
| GppNHp | Guanosín-5'-il imido difosfato |
| GTP | Guanosín-5' trifosfato |
| GTPasa | Guanosín trifosfatasa |
| IF-1, IF-2, IF-3 | Factores de iniciación 1,2 y 3 |
| MgAc ₂ | Acetato magnésico |
| mRNA | RNA mensajero |
| NaAc | Acetato sódico |
| PCMB | Para-cloromercuribenzoato |
| PEP | Fosfoenolpiruvato |
| Phe | Fenilalanina, fenilalanil- |
| P _i | Ortofosfato |
| PK | Piruvato-kinasa |
| poli(U) | Acido poliuridílico |
| Pur | Puromicina |
| p/v | Peso/volumen |
| RF-1, RF-2, RF-3 | Factores de terminación |
| RNA | Acido ribonucleico |
| RNasa | Ribonucleasa |
| RRF | Factor de liberación de los ribosomas del mRNA |

| | |
|---------------------|--|
| S | Svedberg, unidad de velocidad de sedimentación |
| S100 | Sobrenadante de la centrifugación del S30 a 100000xg |
| S30 | Sobrenadante de la centrifugación de lisados celulares de <u>E. coli</u> a 30000xg |
| Ser | Serina, seril- |
| 70S | Ribosoma de Procariontes |
| Sitio A | Sitio ribosómico aceptor |
| Sitio P | Sitio ribosómico donador |
| TCA | Acido tricloroacético |
| TEMED | N, N, N', N' tetrametilen-etilen-diamina |
| 30S | Subunidad ribosómica pequeña en Procariontes |
| Tris | Tris-(hidroximetil)aminometano |
| tRNA | RNA de transferencia |
| tRNA ^{Phe} | tRNA específico para fenilalanina |
| tRNA ^{Tyr} | tRNA específico para tirosina |
| Tyr | Tirosina, tirosinil- |
| UAA, UAG, UGA | Codones de terminación |
| Val | Valina |
| v/v | Volumen/volumen |

En cuanto a las abreviaturas de las unidades de medida, se han seguido las recomendaciones actuales del sistema métrico decimal. Para las abreviaturas de los aminoácidos, ácidos nucleicos y nucleotidos hemos seguido las normas dadas por la IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature, recogidas en las siguientes revistas: J. Biol. Chem. (1966) 241, 2491; J. Biol. Chem. (1974) 249, 1.

CAPITULO I .

I N T R O D U C C I O N

- I.1. Biosíntesis de proteínas
- I.2. Inhibidores específicos de la síntesis de proteínas
- I.3. Planteamiento de nuestro trabajo

I.1. Biosíntesis de proteínas

La biosíntesis de proteínas es un proceso extremadamente complejo que, junto con la replicación y la transcripción del DNA, conduce a la transferencia de información genética en los seres vivos. Excepto algunos pequeños polipéptidos, todas las proteínas se sintetizan por el mismo mecanismo básico, el cual es aparentemente general en todo el mundo vivo. El proceso de la síntesis de proteínas es el resultado de un gran número de etapas coordinadas y son los ribosomas las partículas celulares encargadas de llevarlo a cabo.

En resumen, la síntesis de proteínas implica: a) el comienzo de la síntesis de una cadena protéica en el sitio correcto del RNA mensajero, b) el movimiento del ribosoma a lo largo del mensajero y concomitantemente la polimerización de la cadena peptídica y c) la liberación de la cadena completa del ribosoma seguida por el comienzo de la síntesis de una nueva cadena. Estas tres fases del ciclo se denominan iniciación, polimerización y terminación, respectivamente, y las divisiones entre ellas son inevitablemente un poco arbitrarias. A continuación, haremos una breve descripción de las tres etapas de la síntesis de proteínas en E. coli, centrándonos mas detalladamente en la segunda etapa, la polimerización de las cadenas peptídicas, por ser el tema fundamental de nuestro trabajo.

I.1.1. Activación de los aminoácidos

Previamente a la etapa de iniciación de la síntesis de la

cadena protéica, tiene lugar en la célula la activación del grupo carboxilo de los aminoácidos y a continuación la esterificación del mismo con un tRNA específico. Cada molécula de tRNA lleva la información complementaria al mensaje genético en su anticodón y por apareamiento de bases con el codón apropiado del RNA mensajero, ordena a los aminoácidos en su secuencia correcta para la polimerización. Ello significa que tanto la activación como la esterificación de los aminoácidos con la molécula de tRNA deben ser altamente específicas. Los responsables de ambos procesos son un grupo de enzimas conocido como aminoacil-tRNA sintetasas, las cuales poseen la capacidad de reconocer específicamente el aminoácido y su tRNA correspondiente.

La etapa de activación de los aminoácidos no parece requerir la intervención del ribosoma. El aminoácido se activa en presencia de ATP y de la enzima, mediante la formación de un complejo enzima-aminoácidoadenilado. Posteriormente el aminoácido se transfiere al tRNA correspondiente con la liberación de AMP y la regeneración de la enzima libre. El aminoacil-tRNA formado posee tan alto nivel de energía como la molécula de ATP. Dicha energía será utilizada, como veremos mas adelante, durante la polimerización de las cadenas polipeptídicas, concretamente en la formación de cada enlace peptídico. (Kallousek y Konigsberg, 1975, revisión; Ofengand, 1977, revisión).

I.1.2. Iniciación de la cadena polipeptídica

La fase de iniciación de la síntesis de proteínas comprende de todas las etapas que tienen lugar entre la liberación del ribosoma

de una cadena protéica completa y la formación del complejo de iniciación de la siguiente cadena a sintetizar por dicho ribosoma. Este complejo de iniciación está constituido por el ribosoma, el RNA mensajero y el aminoacil-tRNA iniciador. Una serie de factores protéicos IF-1, IF-2 e IF-3 presentes en el líquido de lavado de los ribosomas con alta concentración de sales, dirigen la formación de dicho complejo de iniciación. Las funciones asignadas a cada uno de estos factores, así como las reacciones que tienen lugar durante la iniciación, se muestran esquematizadas en la Figura 1.1.

En primer lugar, el ribosoma 70S se disocia en dos subpartículas 30S y 50S. Dos factores intervienen en el equilibrio de esta reacción, el IF-1 incrementando la velocidad de la disociación del ribosoma y el IF-3 que al unirse a la subunidad 30S bloquea la asociación con la subunidad mayor del ribosoma. El complejo formado por la subunidad 30S, IF-1 e IF-3 fija al RNA mensajero en una posición cercana al codón de iniciación. El factor IF-3 también interviene en el reconocimiento de los sitios de iniciación. A continuación, se une el aminoacil-tRNA iniciador por apareamiento de su anticodón con el codón iniciador del RNA mensajero, situándose en el sitio ribosómico donador(P). En organismos procarióticos, el iniciador universal es el formil-metionil-tRNA_f que procede de la formilación del metionil-tRNA_f por una enzima transformilante. La fijación del f-met-tRNA_f a la subunidad 30S viene mediatizada por el factor IF-2, en presencia de GTP. En esta etapa, el factor IF-3 se desprende del complejo de iniciación 30S, dicho complejo puede fijar entonces la subunidad 50S dando lugar al complejo de iniciación 70S. Concomitantemente, se hidroliza una molécula de GTP y esta hidrólisis ocasiona el desprendimiento del IF-2

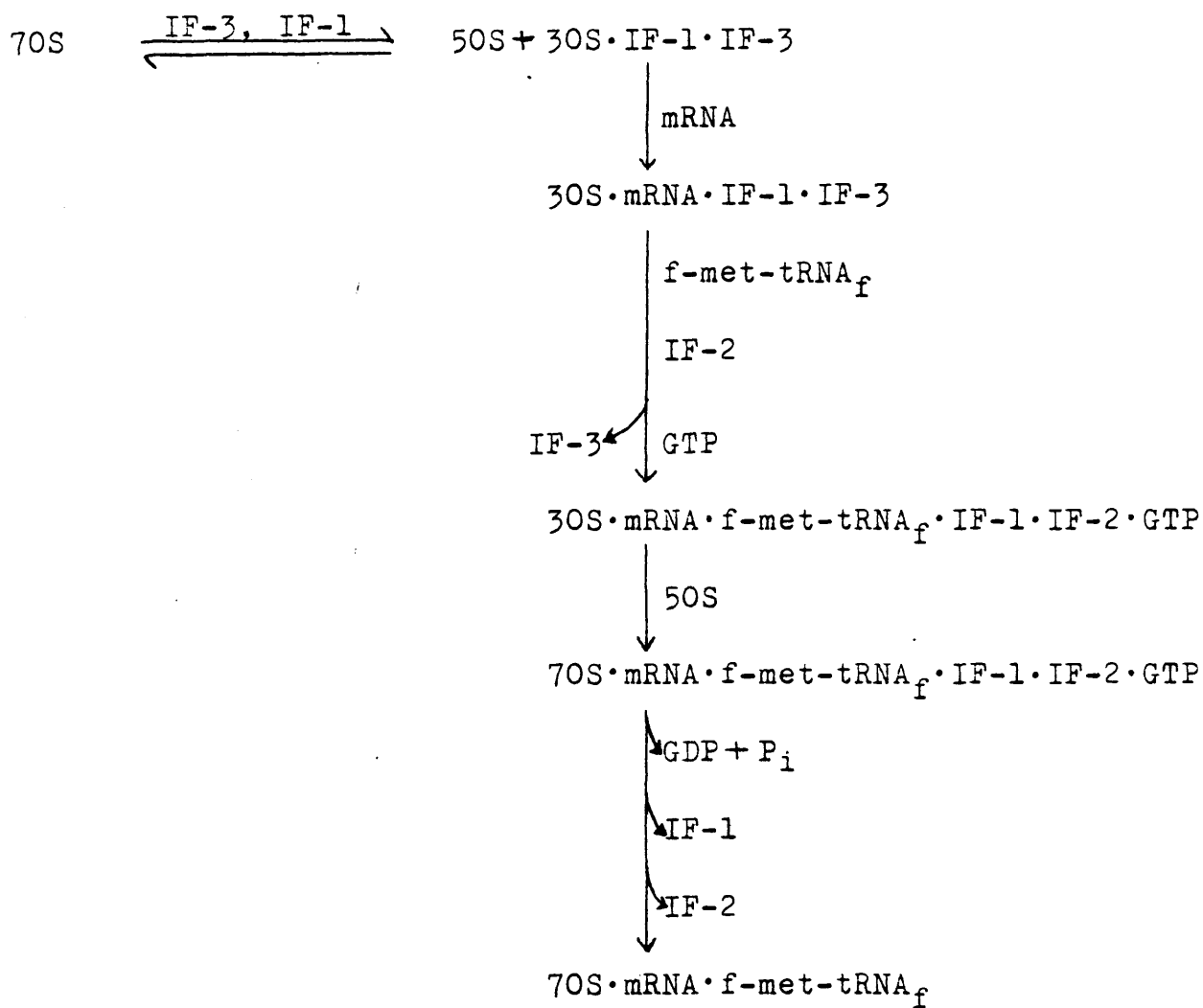


Figura 1.1.- Esquema de la fase de iniciación de la síntesis de proteínas en E. coli, según la descripción hecha en el texto.

del complejo 70S (la velocidad de este proceso es incrementada por IF-1). Los tres factores de iniciación se desprenden en el transcurso de la formación del complejo y pueden volver a utilizarse en un nuevo ciclo de iniciación. El complejo de iniciación 70S formado, es ahora capaz de fijar un segundo aminoacil-tRNA, comenzando la elongación de la cadena polipeptídica. (Jackson, 1975, revisión; Revel, 1977, revisión; Naaktgeboren, Tesis doctoral, 1976).

I.1.3. Polimerización de la cadena polipeptídica

El ciclo de alargamiento de la cadena peptídica se ha dilucidado, en gran parte, gracias a los experimentos realizados con sistemas modelos purificados, en los que se utiliza como mensajero un homopolinucleótido sintético (el ácido poliuridílico) que codifica la síntesis de la polifenilalanina.

Este sistema resulta muy apropiado para el estudio de la polimerización puesto que en él no tiene lugar ni la iniciación, ni la terminación.

La fase de polimerización de la cadena peptídica comprende tres etapas consecutivas bien diferenciadas: 1) la fijación del aminoacil-tRNA dirigida por el RNA mensajero, 2) la formación del enlace peptídico y 3) la translocación.

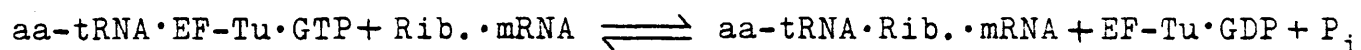
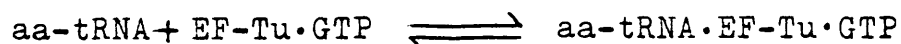
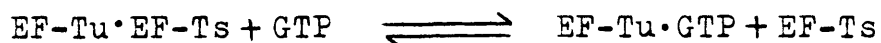
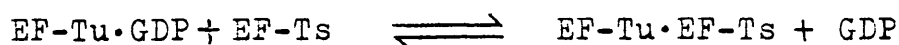
I.1.3.1. Fijación del aminoacil-tRNA

Al término de la iniciación, el ribosoma forma un comple-

jo con el RNA mensajero y con el tRNA iniciador (f-met-tRNA_f) situado en el llamado sitio donador(P) del ribosoma. Para empezar el proceso de polimerización, una molécula de aminoacil-tRNA especificada por el codón 3' próximo al codón iniciador se fija al sitio ribosómico aceptor(A). Esta fijación requiere en el ribosoma procariótico, la participación de los factores de polimerización EF-Tu y EF-Ts y la hidrólisis de GTP (Nishizuka y Lipmann, 1966a; Ravel, 1967). EF-Ts y EF-Tu se encuentran asociados en la fracción sobrenadante de las células de E. coli formando EF-T(Lucas-Lenard y Lipmann, 1966). El factor EF-Tu es termolábil y tiene un peso molecular de 42000-46000 Dalton (Miller y Weissbach, 1977, revisión). En contraste, EF-Ts es termoestable y su peso molecular se estima entre 28.500 y 34.600 Dalton (Hachmann y cols., 1971; Arai y cols, 1973).

El factor EF-Tu promueve la fijación del aminoacil-tRNA al ribosoma via un complejo ternario aa-tRNA·EF-Tu·GTP. Cuando este intermediario interacciona con el ribosoma en presencia del mensajero, el aa-tRNA se transfiere al sitio ribosómico aceptor; concomitantemente la molécula de GTP se hidroliza y el factor EF-Tu se desprende del ribosoma como EF-Tu·GDP (Lucas-Lenard y Haenni, 1968; Shorey y cols., 1969). Este complejo binario se disocia muy lentamente, dada la gran afinidad del EF-Tu por el GDP (Miller y Weissbach, 1970a). La función de EF-Ts es precisamente catalizar el intercambio de GDP por GTP, en el complejo binario, para formar EF-Tu·GTP el cual puede interaccionar con una nueva molécula de aa-tRNA (Miller y Weissbach, 1970b). Por consiguiente el EF-Ts interviene en el reciclamiento del EF-Tu, permitiendo que este factor funcione catalíticamente en el ciclo de fijación (Weissbach y cols., 1970; Ertel y cols., 1968). Resumiremos las

reacciones que tienen lugar en la etapa de fijación, en las siguientes ecuaciones:



La hidrólisis del GTP promueve el desprendimiento del factor EF-Tu de la superficie ribosómica. Si se sustituye el GTP por sus análogos no hidrolizables GMPPCP o GMPPNP, se fija el aminoacil-tRNA al ribosoma (Skoultchi y cols., 1970) pero permanecen unidos al mismo el EF-Tu y el nucleótido de guanosina que incapacitan al aa-tRNA, recientemente fijado, para participar en la formación del enlace peptídico (Ono y cols., 1969).

I.1.3.2. Formación del enlace peptídico

La formación del enlace peptídico en la síntesis de proteínas, tiene lugar inmediatamente después de la fijación del aa-tRNA al sitio ribosómico A. Este proceso implica la transferencia de la cadena peptídica naciente (o bien del residuo f-metionil en el primer enlace peptídico), del peptidil-tRNA situado en el sitio P al aminoacil-tRNA fijado en el sitio A. Ello supone la rotura del enlace ester del peptidil-tRNA (o del f-met-tRNA) y la formación de un enlace peptídico

con el grupo α - amino del aminacil-tRNA (Harris y Pestka, 1977, revisión).

La entidad catalítica responsable de este proceso se denomina peptidil-transferasa (Monro y cols., 1967). Dicha actividad enzimática es una parte integrante de la subunidad mayor del ribosoma (Monro, 1967; Maden y cols., 1968) y consta de dos sitios de fijación para los sustratos y un centro catalítico. La actividad peptidil-transferasa no precisa ni factores solubles, ni fuentes de energía externa, puesto que la energía necesaria para la formación del enlace peptídico se obtiene de la hidrólisis del enlace ester del peptidil-tRNA.

En el estudio de la formación del enlace peptídico como reacción aislada, ha sido de gran ayuda el uso de un antibiótico nucleosídico, la puromicina (un análogo de la porción aminoaciladenosina terminal, común a todos los aminoacil-tRNAs) (Yarmolinsky y de La Haba, 1959). Este antibiótico constituye un sustrato aceptor apropiado para la peptidil-transferasa y es capaz de reaccionar con el peptidil-tRNA del sitio donador, formando peptidil-puromicina (Morris y Schweet, 1961; Rabinovitz y Fisher, 1962) la cual se desprende del ribosoma, interrumpiéndose la elongación de la cadena polipeptídica (Pestka, 1971).

Estudios de reactividad de distintos sustratos con la puromicina, han proporcionado una definición operacional para los sitios ribosómicos aceptor (A) y donador (P), de tal forma que los sustratos que reaccionan con la puromicina en ausencia de factores y GTP, se consideran situados en el sitio P, mientras que los sustratos no reactivos con dicho antibiótico estarán situados en el sitio A (Traut y Monro, 1964).

I.1.3.3. Translocación

Después de la formación del enlace peptídico, el peptidil-tRNA queda fijado en el sitio A y el tRNA desacilado en el sitio P. Para que la polimerización de la cadena peptídica continúe es preciso que el peptidil-tRNA transloque del sitio A al P, pudiendo entonces fijarse un nuevo aminoacil-tRNA en el sitio A desocupado. Este proceso se conoce con el nombre de translocación y es uno de los más complicados de la síntesis de proteínas. En la translocación ocurren simultáneamente tres reacciones íntimamente relacionadas: 1) movimiento del peptidil-tRNA del sitio A al P, 2) avance del RNA mensajero en la longitud de un codón y 3) eyección del tRNA desacilado del sitio P. La translocación requiere la participación del factor de elongación G y la hidrólisis de una molécula de GTP (Conway y Lipmann, 1964; Nishizuka y Lipmann, 1966b).

El factor de elongación G es una proteína del sobrenadante y supone alrededor del 2% de la proteína total de E. coli (Leder y cols., 1969). Consiste en una cadena polipeptídica sencilla cuyo peso molecular está comprendido entre 72000 y 84000 Dalton (Kaziro y cols. 1972; Parmeggiani y Gottschalk, 1969). La implicación del factor G y del GTP en la translocación del peptidil-tRNA se estudió en ribosomas que tenían el sitio P ocupado por un aminoacil-tRNA. Estos ribosomas pueden fijar una nueva molécula de aminoacil-tRNA en el sitio A dando lugar a la formación de un dipeptidil-tRNA, el cual requiere la presencia de EF-G y de GTP para reaccionar con la puromicina. Así mismo, la posterior elongación del dipeptidil-tRNA formado, depende de la adición del factor y de GTP (Haenni y Lucas-Lenard, 1968; Erbe y cols., 1969).

Estos resultados indican que después de la formación del enlace peptídico, el peptidil-tRNA queda fijado al sitio A y precisa del EF-G y de GTP para translocar al sitio P.

Existen muchos datos experimentales que indican que el movimiento del peptidil-tRNA y del RNA mensajero ocurren simultáneamente. El movimiento relativo del RNA mensajero en la longitud de tres nucleótidos, permite la traducción de los sucesivos codones del mensaje genético; ha sido estudiado por diferentes técnicas y todas ellas muestran el requerimiento de EF-G y de GTP (Gupta y cols., 1971; Thach y Thach, 1971). Este mismo requerimiento se observa en la tercera reacción del proceso de translocación, la salida del tRNA desacilado del sitio ribosómico P. La eyección del tRNA precisa que el sitio aceptor esté ocupado con tRNA acilado o desacilado, (Kuriki y Kaji, 1968; Lucas-Lenard y Haenni, 1969) y transcurre a la misma velocidad que la translocación del peptidil-tRNA del sitio A al P, lo cual sugiere que ambos acontecimientos están estrechamente relacionados (Lucas-Lenard y Haenni, 1969).

Si bien se ha obtenido una extensa información sobre las interacciones de EF-G, GTP y el ribosoma, el mecanismo exacto del proceso de translocación a nivel molecular es actualmente desconocido. Se han propuesto varias teorías, algunas de las cuales sugieren que el ribosoma sufre cambios conformacionales sustanciales durante este complejo proceso. Los cambios observados en la estructura del ribosoma se basan en el incremento del intercambio de tritio, observado en los ribosomas postranslocados (Chuang y Simpson, 1971) y en la diferente velocidad de sedimentación de los complejos ribosómicos pre y postranslocados, durante la centrifugación a alta velocidad (Schrier

y Noll, 1971). Sin embargo, la interpretación de estos resultados resulta problemática (Infante y Baierlein, 1971), dada la tendencia de los ribosomas a sufrir disociaciones parciales cuando están sometidos a altas fuerzas centrífugas.

I.1.3.3.1. Hidrólisis de GTP asociada a la translocación

El papel de la hidrólisis de GTP en el proceso de translocación, no está todavía muy claro. Se ha considerado durante muchos años que la hidrólisis de GTP jugaba un papel decisivo en este proceso, pero recientes estudios han demostrado que el requerimiento no es absoluto. En efecto, los análogos no hidrolizables del GTP, GppNHp y GppCH₂p, en presencia de cantidades estequiométricas de EF-G pueden sustituir al GTP en la translocación del peptidil-tRNA del sitio A al P (Inoue-Yokosawa y cols., 1974; Modolell y cols., 1975). Estos resultados parecen indicar que la translocación resulta de la correcta fijación del EF-G en el ribosoma, y que la hidrólisis de GTP es necesaria para el desprendimiento del factor, permitiendo así su reciclaje. Por consiguiente, el papel de la hidrólisis de GTP en esta reacción, sería análogo al propuesto en la fijación del aminoacil-tRNA (Yokosawa y cols., 1975; Girbés y cols., 1976) y en la formación del complejo de iniciación (Benne y Voorma, 1972), es decir, el desprendimiento de EF-Tu e IF-2 respectivamente.

La determinación del número de moléculas de GTP hidrolizadas en cada ciclo de elongación, es difícil debido a una gran actividad GTPásica que se observa al mezclar ribosomas y EF-G, en ausencia

de la translocación (apartado I.1.3.3.2.). Hasta el momento, la mejor estimación se ha realizado en nuestro laboratorio, y es de al menos dos moléculas de GTP hidrolizadas por cada enlace peptídico formado (Cabrer y cols., 1976); una molécula se consume en la fijación del aminoacil-tRNA y la otra en la reacción de translocación.

6
53060
I.1.3.3.2. Interacción del EF-G con el ribosoma, desacoplada de la translocación

El factor G puede interaccionar con el ribosoma en ausencia de mRNA y tRNA acilado o desacilado (Conway y Lipmann, 1964). En presencia de GTP se forma un complejo ternario inestable GTP·EF-G·ribosoma, que conduce a la hidrólisis catalítica y desacoplada del GTP (Conway y Lipmann, 1964; Nishizuka y Lipmann, 1966b) dando lugar a la formación de GDP·EF-G·ribosoma, también inestable. La hidrólisis de GTP puede ocurrir igualmente en presencia de subunidades 50S, aunque en este caso la actividad hidrolítica es menor (Modolell y cols., 1971). En presencia del ácido fusídico, un antibiótico esteroídico inhibidor de la síntesis de proteínas in vivo, la actividad GTPásica desacoplada de la translocación se inhibe drásticamente por la formación del complejo estable GDP·EF-G·ribosoma·ácido fusídico, de estequiometría 1:1:1:1 (Bodley y cols., 1970 a y b). Este complejo puede aislarse fácilmente por filtración en Millipore o por centrifugación en gradiente de sacarosa. Los análogos no hidrolizables del GTP, GppCH₂p y GppNHp, pueden sustituir al GTP en la formación del complejo ternario; en este caso los complejos formados son mucho más estables y no re-

quieren la presencia del ácido fusídico para su aislamiento (Kaziro y cols., 1969; Parmeggiani y Gottschalk, 1969; Modolell y cols., 1971).

I.1.4. Terminación de la cadena peptídica

Cuando se han traducido los tripletes del RNA mensajero que codifican para una cadena protéica, la llegada de un codón "sin sentido" impide la continuación de la síntesis y causa la liberación de la proteína completa. Esta proteína se libera del ribosoma por la hidrólisis de su unión ester con el tRNA.

La etapa de terminación tiene lugar en el ribosoma y requiere la participación de factores protéicos del sobrenadante, denominados factores de liberación o terminación RF-1, RF-2 y RF-3. Los codones "sin sentido" que reconocen dichos factores son los codones "ámbar" y "ocre", UAG y UAA respectivamente, así como un tercer codón UGA. El factor RF-1 es activo frente a UAG y UAA, pero no frente a UGA. El otro factor, RF-2, reconoce a los codones UAA y UGA y es inactivo frente a UAG. El RF-3 potencia la acción de RF-1 y RF-2 aunque se desconoce su función in vivo.

El centro peptidil-transferasa parece estar implicado en la hidrólisis del peptidil-tRNA. Esta actividad enzimática se estimula por la presencia de los factores de terminación en el ribosoma. Por otra parte, hay también evidencia del requerimiento en este proceso de la hidrólisis del GTP (posiblemente necesaria para el desprendimiento de los factores de la superficie ribosómica). Una vez desprendida la cadena peptídica completa y los factores de terminación, que-

dan en el ribosoma el tRNA desacilado y el RNA mensajero. El proceso de disociación de este complejo así como los requerimientos necesarios del mismo son poco conocidos; el factor G además de otro nuevo factor, el RRF, parecen estar implicados en este proceso (Hirashima y Kaji, 1972). Revisiones consultadas: Caskey, 1977; Modolell y Vazquez, 1975.

En la Figura 1.2 se representa esquemáticamente la síntesis de proteínas(etapas de polimerización y terminación).

I.1.5. Estructura del ribosoma

Al describir la biosíntesis de proteínas, apenas hemos explicado la estructura del órgano subcelular encargado de llevarla a cabo, el ribosoma. Estas partículas constituyen una parte sustancial de la célula (aproximadamente el 60% del peso seco de E. coli) dado su papel central en el metabolismo celular (Tissières y cols., 1959).

El ribosoma de E. coli tiene un coeficiente de sedimentación de 70 unidades Svedberg (70S) y está constituido por ácido ribonucleico y proteínas. Consta de dos subunidades de diferente tamaño con un coeficiente de sedimentación de 30 y 50 unidades Svedberg (30S y 50S respectivamente), las cuales en condiciones de Mg^{++} aproximadas a las de la célula se unen para formar el ribosoma 70S (Tissières y cols., 1959).

Aproximadamente dos tercios de la masa del ribosoma es RNA. La subunidad pequeña 30S tiene una molécula de RNA 16S y la subunidad mayor tiene dos moléculas, una de RNA 23S y la otra de RNA 5S (Kurland, 1960; Rosset y cols., 1964). La fracción protéica del ribo-

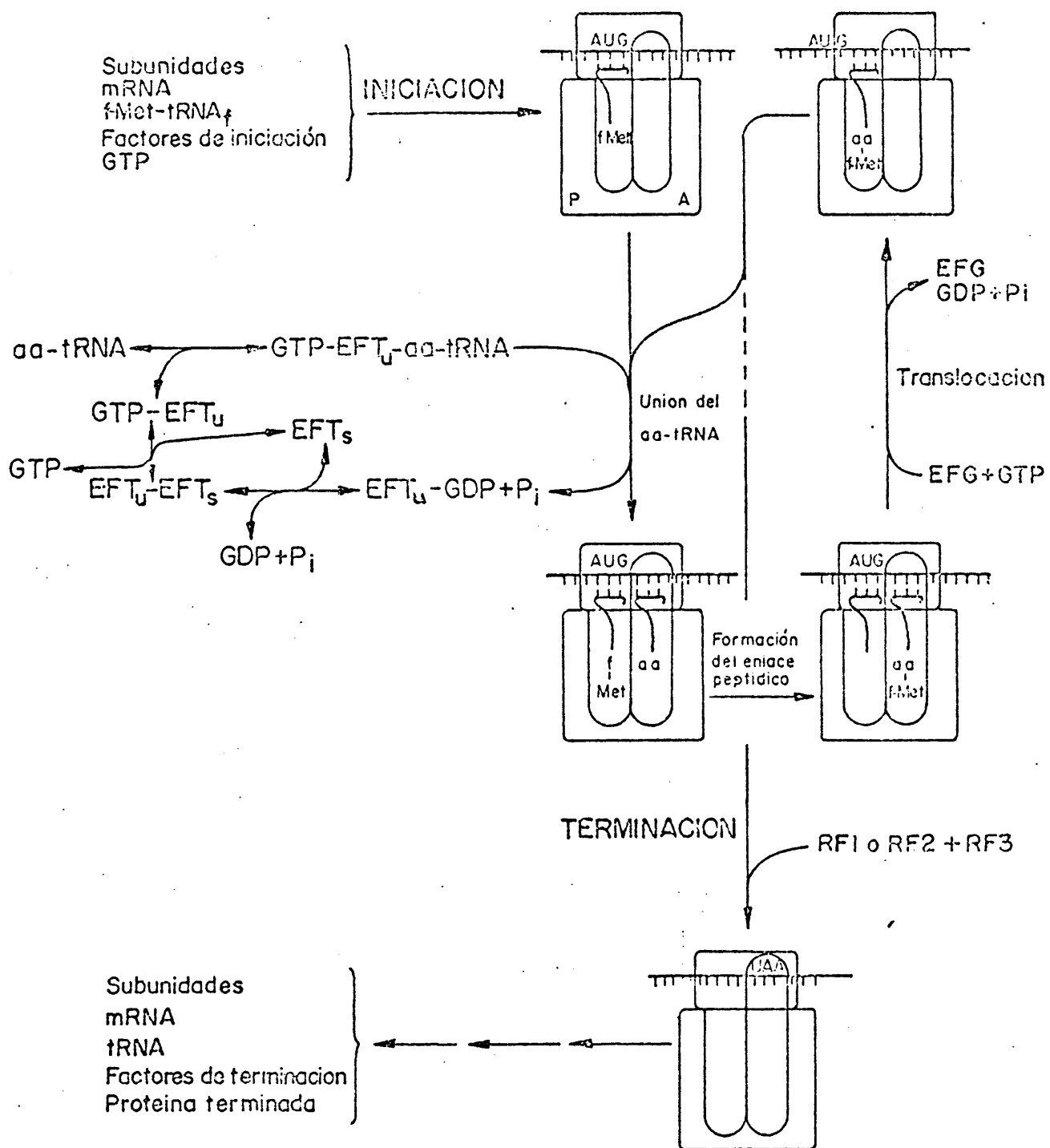


Figura 1.2.- Representación esquemática de la biosíntesis de proteínas en *E. coli*. Tomada de Modolell y Vazquez (1975).

soma representa tan solo un tercio de su masa y está constituida por 53 proteínas distintas. El análisis electroforético en gel de poliacrilamida muestra que hay 21 proteínas en la subunidad pequeña y 32 en la subunidad mayor (Kaltschmidt y Wittmann, 1970; Petterson y cols., 1976; Osterberg y cols., 1977).

En la Tabla 1.I se expresan algunas características físicas del ribosoma de E. coli.

La disposición tridimensional del ribosoma de E. coli se ha estudiado por microscopía electrónica. Las diferentes interpretaciones dadas a los resultados por el grupo de Stöffler y Wittmann (1977) y el de Lake y cols. (1974), han sugerido dos modelos estructurales que difieren fundamentalmente en la disposición de las subunidades y en la simetría de las mismas.

En cuanto al modelo funcional del ribosoma, el más aceptado actualmente es el modelo con dos sitios para translocación, originalmente propuesto por Watson (1964) y por Traut y Monro (1964). Según este modelo, el ribosoma tiene dos sitios de fijación para el tRNA denominados sitio P (sitio donador) y sitio A (sitio aceptor). Estos dos sitios están bien definidos en la subunidad 50S (ver apartado I.1.3.2); en cambio se ha asumido, por razones estructurales, que en la subunidad pequeña solo habría un sitio para la interacción del mRNA y del tRNA y que correspondería al sitio A (Kurland, 1972). Sin embargo, recientemente se han aportado datos que sugieren además la existencia de una interacción similar en el sitio P (Wurmbach y Nierhaus, 1979). Por tanto, parece que los dos sitios ribosómicos comprenden parte de ambas subunidades.

Tabla 1.I.- Características físicas de los ribosomas y subunidades de E. coli.

| | Ribosomas | Subunidades | |
|-------------------------------------|-----------|-------------|-----------|
| Coefficiente de sedimentación | 70S | 30S | 50S (a) |
| Peso molecular x 10 ⁶ | 2,49 | 0,87 | 1,55 (b) |
| E _{1%} ²⁶⁰ | 145±3 | 145±3 | 148±4 (c) |

a) Tissiéres y cols., 1959

b) Koppel, 1974

c) Hill y cols., 1969

I.1.6. Relación entre estructura y función del ribosoma

El ribosoma es un complejo multimacromolecular cuyas propiedades funcionales vienen determinadas por numerosas interacciones cooperativas entre sus componentes, RNA y proteínas. Este orgánulo tiene sitios de fijación para el mRNA, tRNA, factores etc., los cuales interaccionan con él en una secuencia temporal y espacial muy precisa. Sin embargo, el ribosoma no es un soporte inerte donde tiene lugar la síntesis de proteínas, sino que él mismo participa intimamente y modula las reacciones sufriendo cambios conformacionales durante la síntesis.

Aunque se conocen bien los aspectos funcionales del proceso de traducción, quedan todavía por elucidar los mecanismos moleculares y la identidad de los componentes ribosómicos implicados en este proceso tan complejo. En este aspecto, ha sido de gran ayuda el diseño y la utilización de sistemas modelos experimentales (que permiten estudiar aisladamente las distintas etapas en que podemos dividir la síntesis protéica), el estudio del modo de acción de antibióticos, la obtención de mutantes ribosómicos etc., etc.

I.2. Inhibidores específicos de la síntesis de proteínas

Entre los métodos utilizados en el estudio de la biosíntesis de proteínas, ocupa un lugar destacado el uso de antibióticos que bloquean específicamente diversas etapas de dicho proceso. Las investigaciones sobre el modo de acción de estos agentes inhibidores son

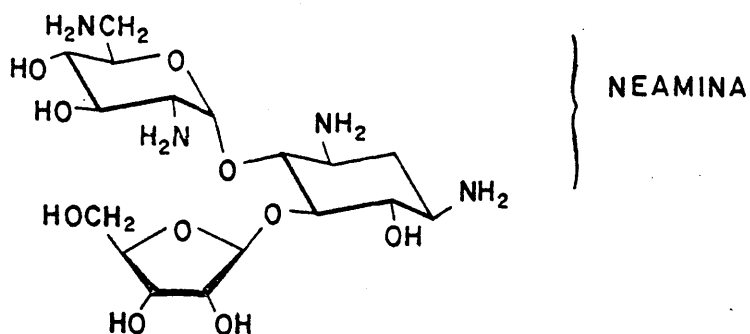
de gran utilidad no solo por sus importantes aplicaciones farmacológicas, sino también porque nos ayudan a conocer más profundamente los mecanismos moleculares de las distintas etapas de la síntesis, inhibidas.

En el trabajo que ha dado lugar a esta tesis hemos utilizado varios tipos de antibióticos. De ellos, la puromicina y el ácido fusídico se emplean en dos sistemas modelo in vitro que estudian dos reacciones típicamente ribosómicas: la formación del enlace peptídico y la interacción del factor G con el ribosoma, respectivamente (ver apartados I.1.3.2 y I.1.3.3.2). El modo de acción de estos dos compuestos ha sido objeto de numerosos estudios y se conoce con claridad.

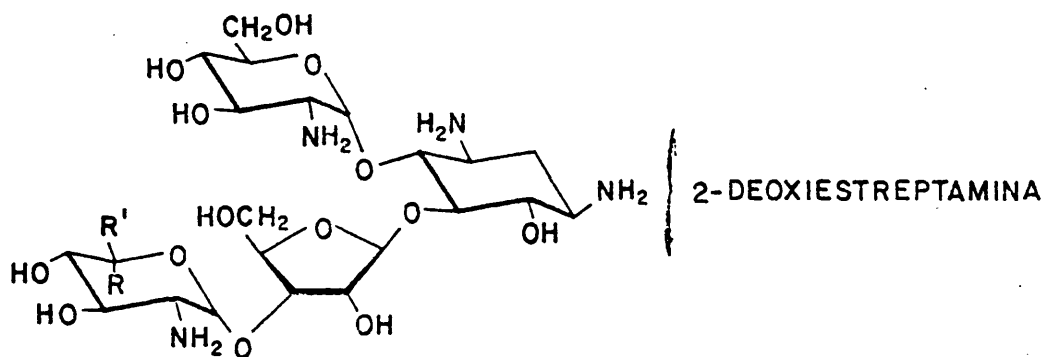
Describiremos a continuación, más detalladamente, el otro gran grupo de antibióticos objeto de nuestro estudio, los antibióticos aminoglicosídicos.

I.2.1 Antibióticos aminoglicosídicos

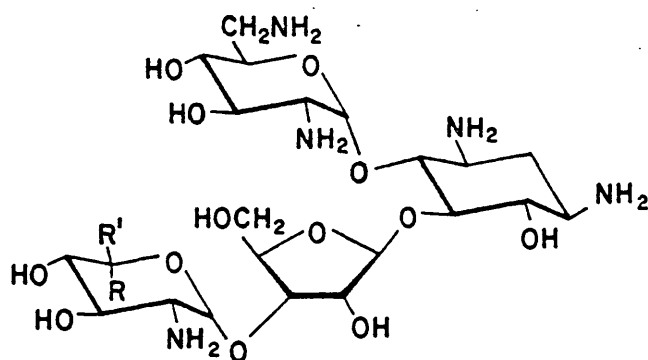
Bajo este nombre se agrupa a un amplio número de compuestos que poseen una gran diversidad funcional y estructural. De entre todos ellos hemos centrado nuestro trabajo en los siguientes: Neomicinas B y C, paromomicina, ribostamicina y neamina (del grupo de las neomicinas); las Kanamicinas A y B y tobramicina (pertenecientes al grupo de las Kanamicinas); las gentamicinas C_1 , C_{1a} , sisomicina y verdamicina; la estreptomicina y el antibiótico relacionado, bluensomicina y por último la higromicina B. Las estructuras químicas de estos compuestos se muestran en las Figuras 1.3, 1.4 y 1.5 (Umezawa, 1975), con excepción de la verdamicina aún por elucidar.



RIBOSTAMICINA

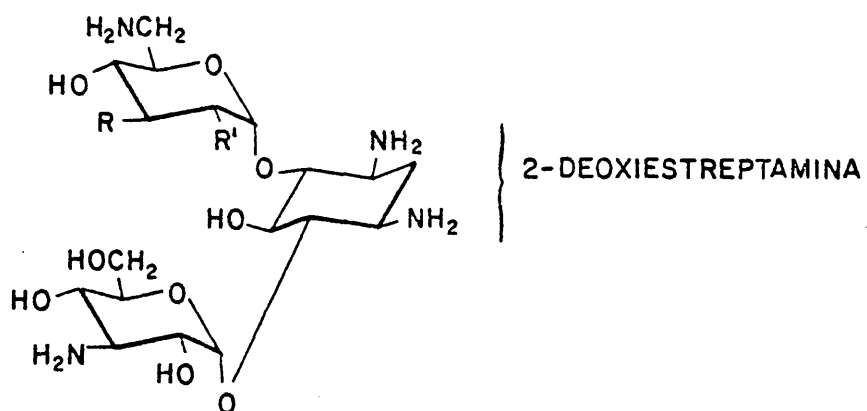


PAROMOMICINA I $R = CH_2NH_2$, $R' = H$
 PAROMOMICINA II $R = H$, $R' = CH_2NH_2$

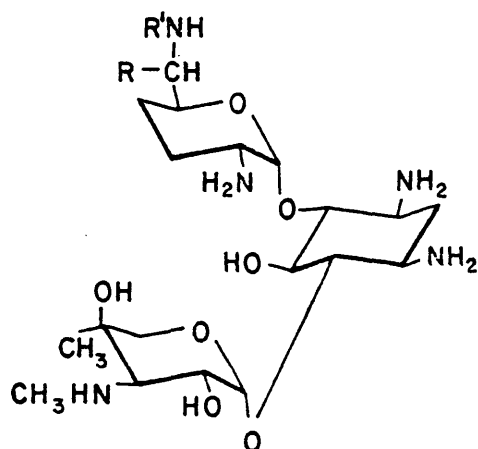


NEOMICINA B $R = CH_2NH_2$, $R' = H$
 NEOMICINA C $R = H$, $R' = CH_2NH_2$

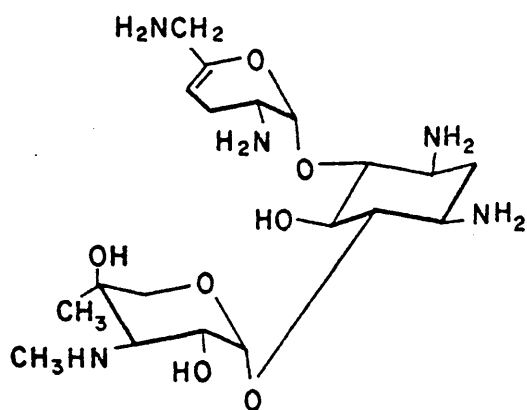
Figura 1.3.- Estructura química de las neomicinas.



| | | |
|--------------|--------|----------------------|
| KANAMICINA A | R = OH | R' = OH |
| KANAMICINA B | R = OH | R' = NH ₂ |
| TOBRAMICINA | R = H | R' = NH ₂ |



| | |
|-----------------------------|--------------------------|
| GENTAMICINA C ₁ | R = R' = CH ₃ |
| GENTAMICINA C _{1A} | R = R' = H |

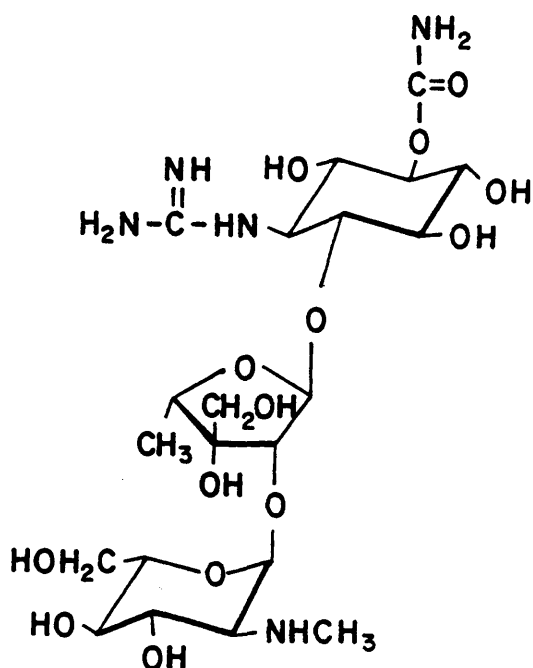
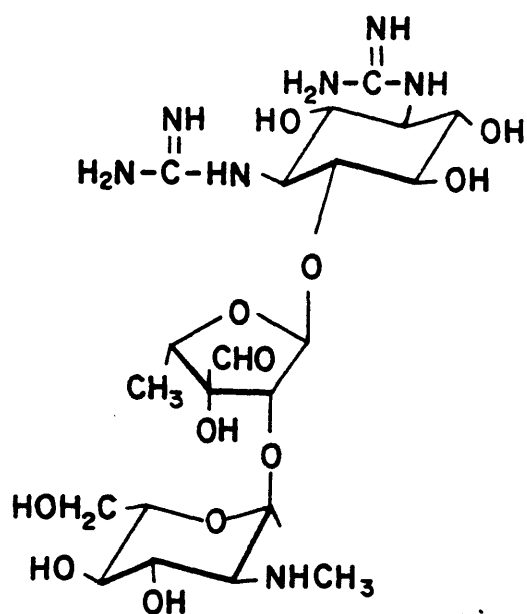


SISOMICINA

Figura 1.4.- Estructura química de las kanamicinas y gentamicinas.

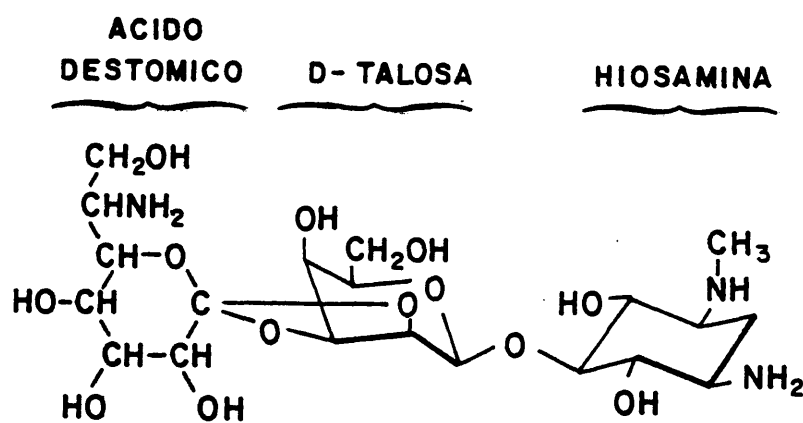
ESTREPTIDINA

BLUENSIDINA



ESTREPTOMICINA

BLUENSOMICINA



HIGROMICINA B

Figura 1.5.- Estructura química de la estreptomicina, bluensomicina e higromicina B.

Como características comunes a todos ellos podemos señalar:

- a) un residuo aminoazucar en su estructura.
- b) naturaleza catiónica.
- c) un amplio espectro de actividad antibacteriana.
- d) inducen errores en la lectura del mensaje genético, que resulta en la incorporación de aminoácidos que no corresponden a los tripletes codificantes del RNA mensajero.
- e) tienen efecto bactericida, a diferencia de otros inhibidores de la síntesis de proteínas en bacterias, que son bacteriostáticos (Vazquez, 1979).

El residuo aminoazucar es un requisito indispensable para la actividad biológica de los antibióticos aminoazucarados (Tanaka y cols., 1967; Masukawa y Tanaka, 1968; Davies, 1970). Sin embargo, este residuo no es suficiente, pues debe estar unido a otros aminoazúcares distintos para permitir la actividad biológica del antibiótico (Benveniste y Davies, 1973).

Atendiendo a la naturaleza del resto aminoazucar podemos distinguir: los antibióticos que poseen deoxiestreptamina (los grupos de las neomicinas, kanamicinas, gentamicinas e higromicina B), estreptamina (estreptomycin) y bluensidina (bluensomicina) (Vazquez, 1979). Como veremos en el capítulo de resultados, el efecto de los antibióticos aminoglicosídicos en la síntesis de proteínas, guarda una estrecha relación con su mayor o menor complejidad estructural, así como con la naturaleza del aminoazucar que posean.

Los antibióticos aminoglicosídicos se han considerado tradicionalmente como drogas que interferían con la síntesis de proteínas

por fijarse a la subunidad 30S (Pestka, revisión, 1977). Debido a su capacidad para inducir errores en el proceso de traducción se clasificaron como un grupo de compuestos homogéneo, con un mecanismo de acción muy similar. Sin embargo, Davies y Davis, en el año 1968, sugirieron ya la considerable heterogeneidad de estos antibióticos en cuanto a su efecto en la síntesis polipeptídica dirigida por polinucleótidos sintéticos. Actualmente, las diferencias en el sitio y el modo de acción de estas drogas se han puesto de manifiesto mediante estudios bioquímicos y genéticos.

I.2.1.1. La estreptomicina y antibióticos relacionados

Dentro del grupo de los aminoglicosídicos, la estreptomicina y los antibióticos relacionados (bluensomicina, dihidroestreptomicina, etc.) son sin duda los antibióticos más estudiados. Estos compuestos se fijan específicamente a un sitio ribosómico localizado en la subunidad 30S (Chang y Flask, 1972; Schreiner y Nierhaus, 1973). La interacción del antibiótico con dicha subunidad parece ser, no obstante, influenciada por varias proteínas ribosómicas, como se ha comprobado por experimentos de reconstitución (Schreiner y Nierhaus, 1973) y por estudios con anticuerpos específicos para proteínas ribosómicas (Lelong y cols., 1974). Por otra parte, los estudios genéticos en mutantes resistentes y dependientes de la estreptomicina muestran alterada la proteína S12 de la subunidad pequeña del ribosoma. Todavía es motivo de controversia si esta proteína responsable de la sensibilidad al antibiótico, es una parte integrante del sitio de fi-

jación.

La estreptomicina y los antibióticos relacionados inhiben la síntesis de proteínas en las etapas de iniciación, polimerización y terminación. Estos compuestos no afectan la formación del complejo de iniciación 70S, pero si la estabilidad de dicho complejo, el cual se rompe en presencia de los antibióticos y libera f-met-tRNA (Modolell y Davis, 1970; Lelong y cols., 1971). La estreptomicina inhibe la polimerización de la cadena polipeptídica (Modolell y Davis, 1969) y esta inhibición provoca la caída prematura de las cadenas peptídicas, de los ribosomas que han fijado el antibiótico (Wallace y cols., 1973)

En adición a los efectos en iniciación y polimerización, la estreptomicina bloquea la fase de terminación de la síntesis proteica, impidiendo el reconocimiento de los factores de liberación RF-1 y RF-2 (Scolnik y cols., 1968). A concentraciones elevadas, inhibe también la actividad disociadora sobre el ribosoma del factor de iniciación IF-3 (Garcia-Patrone y cols., 1971).

Además de inhibir la síntesis, la estreptomicina a concentraciones parcialmente inhibidoras, interfiere con la etapa de reconocimiento del aminoacil-tRNA. La capacidad del antibiótico para causar errores de lectura en la traducción del mensajero, se demostró inicialmente en bacterias intactas. Efectivamente, se comprobó que en presencia de esta droga, a concentraciones subletales, tiene lugar la supresión fenotípica de ciertas mutaciones auxotróficas (Gorini y Kataja, 1965), así como la supresión de mutaciones "sin sentido" ámbar y ocre, de diferentes sistemas bacterianos (Davies, 1966; revisión). El efecto sobre la fidelidad de la traducción, fué confirmado en sistemas bacterianos acelulares dirigidos por polinucleoti-

dos sintéticos (Davies y cols., 1964; Davies y Davis, 1968). En estos sistemas in vitro, la estreptomicina inhibe la incorporación del aminoácido correctamente codificado por el mensajero y causa una notable incorporación de otros aminoácidos incorrectos. Un efecto similar de la estreptomicina se ha detectado recientemente en sistemas dirigidos por RNA mensajeros naturales (Tai y cols., 1978).

Todas estas evidencias experimentales, sugieren que los efectos inhibidores de la estreptomicina en iniciación, polimerización y terminación son efectos pleiotrópicos debidos a la misma interacción del antibiótico con la subunidad ribosómica 30S, lo cual ocasiona un reordenamiento o distorsión que afecta a numerosos componentes de dicha subunidad y en consecuencia, a la actividad del ribosoma.

I.2.1.2. Antibióticos aminoglicosídicos que contienen un residuo de 2-deoxiestreptamina

El efecto en la síntesis de proteínas de este grupo de antibióticos aminoglicosídicos se ha estudiado menos detalladamente que el de la estreptomicina y los antibióticos afines.

En la etapa de iniciación de la síntesis protéica la neomicina y la kanamicina, al igual que la estreptomicina, inhiben la disociación del ribosoma 70S inducida in vitro por el factor de iniciación IF-3; la neomicina es cien veces más activa en este ensayo que los otros dos antibióticos citados (Garcia-Patrone y cols., 1971). El trabajo realizado por Lando y cols., demostró que la neomicina B y la paromomicina inhiben significativamente, aunque a concentracio-

nes elevadas, la formación del complejo de iniciación 70S impidiendo la fijación del f-met-tRNA a los ribosomas, dependiente de GTP y los factores de iniciación (Lando y cols., 1973); sin embargo, la neamina, la kanamicina y la gentamicina ejercen un débil efecto en esta reacción. Estos autores concluyen, que el modo de acción primario de estos antibióticos aminoglicosídicos no es su efecto en la etapa de iniciación, puesto que para inhibir significativamente esta etapa se necesitan concentraciones del antibiótico mucho más elevadas que las requeridas para inducir errores en la traducción del mensajero. En consecuencia, la interferencia de estas drogas con la etapa de reconocimiento del aminoacil-tRNA correcto, jugaría según estos autores, un papel fundamental en su acción bactericida (Lando y cols., 1973).

De manera análoga a la estreptomycin, los antibióticos aminoglicosídicos que contienen deoxiestreptamina inducen errores de lectura en células intactas, puesto que producen supresión fenotípica en mutantes auxótrofos de E. coli, crecidos en ausencia de algunos aminoácidos esenciales, pero en presencia de dichos antibióticos (Gorini y Kataja, 1965). En sistemas libres de células, bloquean la síntesis polipeptídica dirigida por el RNA mensajero del fago R17 (Benveniste y Davis, 1973) e inducen la incorporación de aminoácidos no codificados por el mensajero, en diferentes sistemas (Davies y cols., 1965; Davies y Davis, 1968; Lando y cols., 1973). Sin embargo, los antibióticos de los grupos de la kanamicina, neomicina, gentamicina, e higromicina B, causan un nivel de errores en la lectura del mensajero mucho más elevado que el inducido por la estreptomycin y la bluensomicina, y no muestran como estos últimos una relación estequiométrica droga:ribosoma, de uno a uno en este efecto; al estudiar

el efecto de la concentración de los antibióticos que contienen deoxiestreptamina, en la incorporación de aminoácidos erróneamente codificados y en la inhibición de la síntesis polipeptídica dirigida por mensajeros sintéticos, Davies y Davis sugirieron que dichas drogas interaccionan con múltiples sitios en el ribosoma (Davies y Davis, 1968). Esta sugerencia ha sido recientemente corroborada por Tai y Davis (1979) y Kühberger y cols. (1979), al observar el efecto multifásico de la concentración de gentamicina en la síntesis peptídica dirigida por mensajeros naturales. La hipótesis de los múltiples sitios de acción es consistente con la dificultad para aislar mutantes, en una sola etapa de selección, con alto nivel de resistencia a estos antibióticos.

¿ En que subunidad ribosómica están localizados los sitios de acción de estos compuestos?. Para localizar la acción de un antibiótico en un sitio o subunidad particular, se utilizan una serie de criterios directos e indirectos como son: la fijación del antibiótico radiactivo a cada subunidad, ensayos de competencia con otras drogas de las que se conoce su sitio de acción, la interferencia con una función adscrita a una subunidad, la obtención de mutantes ribosómicos resistentes al antibiótico en cuestión etc.....

En el caso de los antibióticos aminoglicosídicos que contienen deoxiestreptamina, los problemas en el aislamiento de mutantes resistentes estables, así como en la obtención de los compuestos isotópicamente marcados sin pérdida de su actividad, han dificultado la localización de los sitios de acción en una u otra subunidad o en ambas.

Si durante muchos años se ha considerado la subunidad 30S

como el blanco de estos compuestos, los trabajos recientemente publicados parecen extender el sitio de acción también a la 50S. De hecho, los experimentos realizados por Misumi y cols. (1978) con la [^3H]kanamicina, muestran que dicho antibiótico se fija con alta afinidad a ambas subunidades ribosómicas, siendo mayor la afinidad por la subunidad pequeña. La fijación de la [^3H]kanamicina es fuertemente inhibida por la gentamicina y la neomicina (lo cual sugiere que dichos antibióticos tienen el mismo sitio de fijación al ribosoma), pero no por la estreptomicina.

Por otra parte los antibióticos de los grupos de la neomicina, kanamicina y gentamicina, estabilizan en mayor o menor grado el complejo formado por EF-G, GDP y la subunidad ribosómica 50S, careciendo de efecto la estreptomicina y los antibióticos relacionados (Campuzano y cols., 1979a).

Las diferencias existentes entre el sitio de acción de la estreptomicina y los compuestos con deoxiestreptamina, se han puesto también de manifiesto por los estudios genéticos realizados con mutantes resistentes a este tipo de antibióticos. Si la resistencia a la estreptomicina es debida a una sola mutación en la proteína S12 de la subunidad pequeña, dos genes separados son los responsables de la resistencia a la neamicina (Cannon y cols., 1974). Más sorprendente resulta el descubrimiento de que la proteína L6 de la subunidad 50S está alterada en un mutante resistente a la gentamicina (Buckel y cols., 1977). Los ribosomas de este mutante, en presencia del antibiótico, traducen el mensajero con un nivel de errores muy reducido con respecto a los del tipo salvaje, sin embargo, la inhibición de la síntesis polipeptídica es muy similar en ambos (Kühberger y cols., 1979).

Al parecer en este caso la resistencia de la cepa está relacionada, además, con una disminución de la permeabilidad de la célula al antibiótico.

I.2.2. La viomicina

Otro antibiótico muy utilizado en nuestro trabajo experimental ha sido la viomicina. Este es un antibiótico básico de naturaleza peptídica que inhibe potentemente la síntesis de proteínas (Tanaka e Iguza, 1968; Alexander y cols., 1969). En un sistema libre de células de E. coli, la viomicina exhibe una acción dual sobre las funciones ribosómicas interfiriendo en las etapas de iniciación y polimerización de la síntesis. El análisis de estos efectos revela que el antibiótico impide la fijación del f-met-tRNA_f a la subunidad ribosómica 30S; en la polimerización, la viomicina impide la translocación del Ac-Phe-tRNA dependiente del factor G y de GTP y no afecta significativamente ni la fijación del aminoacil-tRNA ni la formación del enlace peptídico (Liou y Tanaka, 1976). El efecto inhibitorio en la translocación ha sido posteriormente confirmado en un sistema de síntesis activo con polisomas de E. coli (Modolell y Vazquez, 1977).

Los resultados obtenidos al investigar el modo de acción de la viomicina en la translocación, sugieren que dicho antibiótico impide el movimiento del peptidil-tRNA asociado a dicho proceso, por interferir con su salida del sitio A (Modolell y Vazquez, 1977).

El efecto dual de la viomicina en la síntesis protéica puede ser debido a que el antibiótico posea dos sitios de acción en

el ribosoma. Esta sugerencia viene refrendada por la obtención de dos tipos de mutantes de Mycobacterium smegmatis resistentes al antibiótico, uno de ellos con la subunidad 30S alterada y el otro con la alteración en la 50S (Yamada y cols., 1972). Por otra parte, al estudiar la fijación al ribosoma de [^{14}C] tuberactinomicina O (un antibiótico estrechamente relacionado con la viomicina), se ha observado que dicho antibiótico se fija a ambas subunidades, siendo mayor la afinidad por la subunidad pequeña. La fijación de tuberactinomicina, tanto a la 30S como a la 50S, es revertida por la viomicina, lo cual indica que ambos antibióticos posiblemente tengan los mismos sitios de fijación (Misumi y cols., 1978).

También recientemente, Martinez y cols. (1978) han encontrado que la interacción de la viomicina con el ribosoma modifica la iodación de varias proteínas en ambas subunidades ribosómicas.

I.3. Planteamiento de nuestro trabajo

Las provechosas aplicaciones clínicas de los antibióticos aminoglicosídicos han despertado un gran interés y han estimulado la intensiva investigación de estas drogas. Notables avances se han conseguido en el aislamiento, las propiedades antimicrobianas, la elucidación de estructuras y el descubrimiento de nuevos compuestos. En contraste, el estudio detallado de los efectos de estos antibióticos en la síntesis de proteínas se ha hecho extensivo a muy pocos de ellos.

Con excepción de la estreptomycin y los antibióticos re-

lacionados, los trabajos realizados se han centrado fundamentalmente en una propiedad llamativa de estos antibióticos, su interferencia con la fidelidad de la traducción. En el momento de comenzar esta tesis existían, sin embargo, escasas referencias sobre el modo de acción y el efecto de los compuestos aminoglicosídicos en otras etapas de la síntesis protéica, quedando sin resolver si su efecto sobre la fidelidad de la lectura del mensaje genético es el modo primario de su acción bactericida.

Por este motivo hemos decidido investigar el efecto de algunos antibióticos pertenecientes a este grupo en las tres etapas del ciclo de polimerización (la fijación del aminoacil-tRNA, la formación del enlace peptídico y la translocación del peptidil-tRNA), mediante el uso de sistemas modelos simplificados que reproducen dichas etapas.

Sorprendentemente hemos encontrado que todos los antibióticos ensayados inhiben, en mayor o menor medida, el proceso de translocación.

Posteriormente, hemos profundizado en el mecanismo de inhibición de este proceso utilizando como agente inhibidor la higromicina B, por ser de todos los aminoglicosídicos que poseíamos el menos estudiado.

La segunda parte de nuestro trabajo se ha orientado a conocer el mecanismo detallado por el cual un aminoacil-tRNA erroneamente codificado por el mensajero, se incorpora en una cadena protéica en presencia de los antibióticos aminoglicosídicos. Este conocimiento nos parece de gran utilidad, no solo para comprender las bases moleculares de la inducción de errores en la lectura, sino

tambien para elucidar los mecanismos que aseguran la fidelidad de la traducción en la célula. Para ello, hemos estudiado en un sistema altamente purificado la incorporación en la cadena peptídica del Tyr-tRNA^{Tyr} erroneamente codificado dirigida por ácido poliuridílico, comparándola con la del aminoacil-tRNA codificado, Phe-tRNA^{Phe}.

CAPITULO II

M A T E R I A L E S

- II.1. Células
- II.2. Ribosomas y fracciones solubles
- II.3. Aislamiento de polisomas endógenos
- II.4. Factores de polimerización
- II.5. Preparación de aminoacil-tRNAs
- II.6. Otros materiales

II.1. Células

II.1.1. Crecimiento celular

Hemos utilizado, generalmente, la cepa MRE600 de Escherichia coli (Cammack y Wade, 1965). Esta cepa es deficiente en RNasa I, lo que favorece la obtención de ribosomas al ser menor la degradación del RNA ribosómico durante la preparación. En otros casos (obtención de factores de polimerización EF-T y EF-G) se ha utilizado la cepa B (Berkeley) de E. coli.

Las células se cultivaron a 37°C con fuerte agitación en un medio rico, medio L (Lennox, 1955), que contenía: 10 g de bacto-triptona, 8 g de NaCl y 1 g de extracto de levadura por litro de agua. Una vez esterilizado en autoclave durante 20 min a 1 atmósfera de presión, se añadió glucosa (previamente esterilizada a 0,5 atmósferas durante 20 min) hasta una concentración final de 0,2% (p/v).

El crecimiento de las células se realizó en 4 litros de medio L, repartidos en 6 erlenmeyers de 2 litros, que fueron inoculados con un cultivo fresco de células en fase estacionaria en la proporción del 1% (v/v). El crecimiento se siguió midiendo la densidad óptica a 660 nm en un fotolorímetro Bausch y Lomb Spectronic. Cuando el cultivo alcanzó entre 0,5 y 0,7 u.o., todavía en fase logarítmica, se paró bruscamente el crecimiento enfriando a 0°C con 1/2 volumen de hielo a -20°C.

II.1.2. Recogida y lavado de las células

Las células se recogieron a 0°C por centrifugación en una centrifuga refrigerada Sorvall RC-5, a 5200xg durante 5 min. El rendimiento obtenido fué aproximadamente de 2 g de células (peso húmedo) por litro de cultivo inicial.

Con el fin de eliminar los restos de medio de cultivo, se procedió al lavado de las células con una solución tampón. Para ello se resuspendieron las células en 25 ml de tampón NB sin 2-mercapto-etanol: NH_4Cl 60 mM, Tris-HCl (pH 7,8) 10 mM y MgAc_2 10 mM, por litro de cultivo inicial y se centrifugaron en una centrífuga Sorvall RC2-B a 6000xg durante 5 min a 0°C.

En el caso de no utilizar las células inmediatamente, el sedimento se congeló introduciendo el tubo de centrífuga en una mezcla de acetona y nieve carbónica, guardándose a -20°C hasta su uso.

II.2. Ribosomas y fracciones solubles

II.2.1. Rotura de las células

La rotura de las células para la obtención de sobrenadantes celulares y ribosomas libres, se realizó siguiendo el procedimiento de Nirenberg y Matthaei (1961) con algunas modificaciones introducidas en nuestro laboratorio (Modolell, 1971).

Las células lavadas se trituraron con alúmina, en la proporción de 1,5 g por gramo de células, en un mortero de porcelana

previamente enfriado. En esta operación, así como durante todo el proceso, la temperatura se mantuvo entre 0°C y 4°C. La molienda se llevó a cabo durante 10 ó 20 min, hasta que la pasta adquirió una consistencia gomosa característica. Acortar el tiempo de trituración supone una pérdida en el rendimiento de los ribosomas y alargarlo, disminuye la actividad de los mismos.

II.2.2. Obtención de la fracción S100

La pasta obtenida de la molienda, se extrajo con dos volúmenes de tampón NB y se centrifugó a 18000xg durante 5 min para eliminar la alúmina, células enteras y restos celulares. El sobrenadante que presentaba un aspecto viscoso debido a la presencia de DNA, se trató con 1 µg/ml de DNasa electroforéticamente pura (desprovista de RNasas) durante 5 min a 0°C. Desaparecida la viscosidad, se clarificó por centrifugación a 40000xg durante 20 min y el sobrenadante obtenido (extracto S30) se centrifugó durante 1 hora y 15 min a 165.000xg. Los dos tercios superiores del sobrenadante constituyen el extracto S100 que contiene tRNAs, factores de polimerización G y T, factores de terminación, aminoacil-tRNA, sintetasas y otros componentes más o menos definidos.

El extracto S100 se dializó durante una noche frente a la solución tampón NB con 50% de glicerol. Una vez dializado se clarificó por centrifugación a 12000xg durante 10 min y se guardó, en tubos previamente esterilizados, en N₂ líquido.

II.2.2.1. Purificación parcial de la fracción S100 para carga de tRNA

En algunas ocasiones, el extracto S100 se purificó parcialmente con objeto de eliminar ácidos nucleicos (fundamentalmente tRNAs), nucleótidos, aminoácidos y otras sustancias de bajo peso molecular. Para ello, al sobrenadante S100 fresco se añadió sulfato amónico al 75% de saturación, manteniendo el pH neutro mediante la adición de Tris-Base. Después de centrifugar a 18000xg durante 5 min, el sedimento se resuspendió en 2 ml de solución tampón que contenía: NH_4Cl 350 mM, Tris-HCl (pH 7,8) 50 mM, MgAc_2 10 mM y 2-mercaptoetanol 6 mM. La solución se sometió a filtración a través de una columna de Sephadex G-25 de 1,6x40 cm. La elución se realizó con el mismo tampón y las proteínas eluyeron en el volumen excluido de la columna, mientras que aminoácidos y sustancias de peso molecular inferior a 1000 Dalton, quedaron retenidas.

Para eliminar los tRNAs, la fracción protéica eluída se sometió a cromatografía de cambio iónico en DEAE-celulosa, equilibrada con la solución tampón anteriormente descrita. La proteína eluyó en el volumen excluido de la columna, aproximadamente 15 ml, los cuales se dializaron frente a solución tampón NB con 50% de glicerol, durante unas horas.

El S100 así purificado, se guardó congelado en N_2 líquido.

II.2.3. Ribosomas

El sedimento de la centrifugación a 165.000xg para la obtención del extracto S100, está constituido fundamentalmente por ribosomas.

La purificación de estos ribosomas se realizó mediante una serie de lavados a alta concentración de sales con lo cual se desprenden factores protéicos, mRNAs y peptidil-tRNAs que permanecían unidos a los ribosomas. Para ello, el sedimento (de aspecto compacto, transparente y amarillento) se resuspendió en solución tampón A que contenía NH_4Cl 1 M, MgAc_2 40 mM, Tris-HCl (pH 7,8) 10 mM, EDTA 1 mM y DTT 4 mM y se clarificó por centrifugación a 18000xg durante 10 min. Los ribosomas del sobrenadante volvieron a sedimentarse centrifugando a 165000xg durante 1 hora y 15 min, obteniéndose un sedimento algo menos amarillo.

Después de sucesivos lavados y clarificaciones en el tampón A (aproximadamente de 3 a 4 veces), el sedimento ribosómico quedó totalmente transparente. Los ribosomas se resuspendieron en un pequeño volumen de tampón A (de 0,5 a 1 ml) y se clarificaron. La solución se mezcló con un volumen igual de glicerol, con lo que la concentración salina final fué: NH_4Cl 500 mM, MgAc_2 20 mM, Tris-HCl (pH 7,8) 5 mM, EDTA 0,5 mM, DTT 2 mM y 50% de glicerol.

En estas condiciones, los ribosomas se guardaron sin congelar a -20°C , conservando su actividad durante varios meses.

La concentración de ribosomas en las preparaciones osciló entre 40 y 70 mg/ml y se calculó midiendo la densidad óptica a 260 nm. Asumimos que una solución de ribosomas de 1 mg/ml absorbe

14,5 unidades ópticas a los 260 nm de longitud de onda (Hill y cols., 1969). El rendimiento obtenido en el proceso de purificación fué aproximadamente 1,8%, expresado como peso seco de ribosomas por peso de células.

II.3. Aislamiento de polisomas endógenos

Para la obtención de polisomas endógenos se partió de 1,5 litros de cultivo de E. coli, crecido hasta 0,52 unidades ópticas a 660 nm, en la forma ya descrita. El crecimiento de las células se paró rápidamente añadiendo un volumen de hielo previamente enfriado a -20°C. Las células se recogieron por centrifugación a 5200xg durante 5 min y se resuspendieron en 7 ml de solución tampón formada por: Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM y sacarosa 25% (p/v). Para romper las células, seguimos el método descrito por Godson y Sinsheimer (1967) modificado por Girbés y cols., 1979. A la solución de células, se añadieron 4 ml de una solución que contenía: lisozima 10 mg/ml, Tris-HCl (pH 8,0) 0,25 M y EDTA 4 mM. Después de 10 min a 0°C, se añadieron 10 ml de solución de lisis: Brij 35 5% (p/v), Tris-HCl (pH 7,8) 20 mM, MgAc₂ 35 mM y 1 ml de dodecilmecenosulfonato al 10% (v/v). Se dejó unos minutos a 0°C hasta alcanzar una lisis casi completa, lo cual se observó por una disminución de la turbidez y un aumento de la viscosidad debido a la liberación del DNA celular. En ese momento, se trató el lisado con DNasa electroforéticamente pura (100 µg) y una vez desaparecida la viscosidad, se centrifugó a 12000xg durante 3 min. Durante todo el proceso descrito, la temperatura se mantuvo a 0°C rea-

lizándose todas las operaciones en el menor tiempo posible para evitar la degradación de los polisomas. Por otra parte, tanto las soluciones empleadas como el material utilizado en la purificación, fueron previamente esterilizados para eliminar las posibles RNAsas contaminantes.

El sobrenadante obtenido en la centrifugación, que contenía la mayor parte de los polisomas, se decantó cuidadosamente y se guardó a 0°C. El sedimento, formado por restos celulares y polisomas de gran tamaño, se resuspendió en 4 ml de solución tampón A. Después de centrifugar a 12000xg durante 3 min, el sobrenadante obtenido se unió al extracto polisomal anterior.

Para purificar los polisomas se repartió el extracto en dos tubos de centrífuga que contenían 7 ml de un colchón de sacarosa (tampón A con sacarosa al 60%, p/v). Los tubos se completaron con solución A y se centrifugaron a 165000xg durante 3 horas. Al cabo de este tiempo, los polisomas de gran tamaño habían sedimentado mientras que los polisomas pequeños se encontraban en las capas de sacarosa. Por medio de una jeringa estéril, se extrajeron 4 ml de cada una de estas capas de sacarosa y se diluyeron con solución A hasta un volumen final de 20 ml. El sedimento de cada tubo se resuspendió con 4 ml de solución A y como en el caso anterior, se llevó a un volumen de 20 ml con la misma solución. A partir de este momento, los polisomas de la interfase y del sedimento se purificaron en paralelo pero por separado, sometién dose a dos procesos de lavado a través de un colchón de sacarosa, de la forma ya descrita.

Una vez clarificados y mezclados con igual volumen de glicerol, los polisomas se guardaron a -20°C conservándose durante unos

meses aunque con pérdidas parciales de su actividad. La concentración final de polisomas fué de 10 mg/ml, determinada de la misma forma que la de ribosomas. Las preparaciones obtenidas presentaron la ausencia de actividad GTPasa endógena, requerimientos de factores de polimerización para alargar sus cadenas nacientes e incorporaron en un sistema de síntesis de proteínas con S100, entre 140 y 165 aminoácidos por ribosoma.

II.4. Factores de polimerización

II.4.1. Preparación de los factores EF-T y EF-G

Los factores de polimerización EF-T y EF-G se encuentran en el sobrenadante S100 de los lisados celulares. Hemos purificado dichos factores a homogeneidad electroforética siguiendo el método descrito por Parmeggiani y cols. (1971) con algunas modificaciones en la purificación del EF-T, introducidas por Chinali y cols. (1977).

Se partió de 120 g de células de E. coli B a las que se procesó de la forma descrita en los apartados II.2.1 y II.2.2, para obtener el sobrenadante S100. Los ácidos nucleicos del S100 se precipitaron con una solución de sulfato de protamina al 2% (p/v), en la proporción de 1 ml de solución por 25 ml de sobrenadante. La solución se centrifugó durante 5 min a 18000xg desechándose el precipitado. El sobrenadante (240 ml) se sometió a fraccionamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0°C. Para ello, se llevó al 40% de saturación añadiendo lentamente el volumen necesario de solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturada.

Al sobrenadante de la centrifugación a 6000xg durante 10 min, se añadió $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta el 65% de saturación. Después de centrifugar, el precipitado se resuspendió en 10 ml de solución tampón B: KCl 150 mM Tris-HCl (pH 7,8) 25 mM, DTT 1 mM y 10% de glicerol, dializándose frente a 500 ml de la misma solución durante una noche.

Una vez dializada, la solución de factores crudos se sometió a cromatografía de cambio iónico en una columna (90x2, 6 cm) de DEAE-Sephadex A-50, previamente equilibrada con la solución B. La muestra se eluyó con un gradiente lineal de KCl (4 litros) desde 150 a 350 mM en la misma solución B. El orden de elución de los factores fue el siguiente: EF-T, EF-Tu·GDP y por último EF-G. A partir de este momento, la purificación de EF-T y EF-G se llevó por separado y se detalla a continuación.

EF-T

Las fracciones con actividad EF-T (ensayada como se indica en el apartado II.4.3) se dializaron exhaustivamente frente a una solución tampón C: fosfato potásico (pH 7,1-7,4) 5 mM, DTT 1 mM y glicerol 10%. La solución dializada se aplicó a una columna (20x2, 6 cm) de hidroxilapatito equilibrada con el tampón C y se eluyó con un gradiente (700 ml) de fosfato potásico, desde 20 a 150 mM en tampón C. Se recogieron fracciones de 10 ml, siendo el flujo de la columna de 30 ml a la hora. El pico de actividad EF-T (85 ml) eluido de la columna, se sometió a fraccionamiento con sulfato amónico entre 52% y 75% de saturación. El precipitado se resuspendió en 5 ml de solución tampón D: Tris-HCl (pH 7,8) 25 mM y DTT 1 mM y se dializó frente al mismo tampón durante toda la noche.

La última etapa de purificación del EF-T, consistió en una

electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida (vease apartado II.4.2). Las fracciones que contenían el EF-T ya puro (34 ml), se concentraron con Aquacida II y después de dializar frente a la solución D, se guardaron a -20°C en glicerol 50%.

El grado de pureza de la preparación de EF-T se comprobó por electroforesis unidimensional en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, resultando dos bandas de proteínas correspondientes al EF-Tu y EF-Ts. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry y cols. (1951) y osciló entre 2 y 4,1 mg/ml de proteína, dependiendo de la fracción.

EF-G

Las fracciones de la columna de DEAE-Sephadex A-50 que contenían el factor EF-G (ensayadas por actividad GTPásica dependiente del factor) se llevaron al 59% de saturación de sulfato amónico. El precipitado se resuspendió en un volumen pequeño de solución D y se dializó frente a la misma solución, toda la noche.

El EF-G se purificó a continuación, por electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida (apartado II.4.2) y las tres fracciones activas (30 ml) se procesaron de la forma descrita para el EF-T. Como en el caso de este último, se determinó el grado de pureza de la preparación de EF-G por electroforesis en gel de poliacrilamida (una sola banda se detectó en el gel) y la concentración de proteínas que osciló entre 17 y 31 mg/ml de proteína, según la fracción ensayada.

II.4.2. Electroforesis preparativa

Hemos utilizado el método descrito por Chrambach y Rodband (1971). La electroforesis se realizó en un aparato Poliprep 200 (Buchler Instruments, New York).

El gel de separación, de aproximadamente 5 cm de altura, se formó mezclando: 10,5 ml de Tris-HCl (pH 8,9) 3 M, 21 ml de una solución que contenía 7,5 g de acrilamida y 0,18 g de bisacrilamida en 25 ml de H₂O, 42 ml de solución de persulfato amónico (2,8 mg/ml), 10,5 ml de H₂O y 30 μ l de TEMED. Sobre el gel de separación, una vez polimerizado a temperatura ambiente, se coloca el gel de empaquetamiento. Este gel de menor consistencia que el anterior, se formó mezclando 3,2 ml de Tris-HCl (pH 6,8) 250 mM, 6,4 ml de una solución que contenía 1 g de acrilamida y 0,072 g de bisacrilamida en 10 ml de H₂O, 4,8 ml de sacarosa al 40% (p/v), 8 ml de H₂O, 15 μ l de TEMED y 3,2 ml de una solución de riboflavina (0,04 mg/ml). La polimerización de este segundo gel se realizó en presencia de luz en unos minutos.

La solución tampón de la cámara inferior (recipiente aniónico) era Tris-HCl (pH 7,8) 0,1 M y la de la cámara superior (recipiente catiónico) era Tris-glicina (pH 8,9). Para la elución se utilizó tampón Tris-HCl (pH 7,8) 25 mM.

La muestra, 6 ml, se dializó previamente frente a Tris-HCl (pH 6,9) y DTT 1 mM. Se aplicó en sacarosa al 10% (p/v) y con 2 μ l de azul de bromofenol (2,4 mg/ml) como indicador. La electroforesis se realizó a 35 mA (100 voltios) hasta que la muestra, visualizada por el marcador, penetra en el gel de separación. En ese momento, la intensidad se subió a 40 mA manteniéndose así durante 16 horas. Las

proteínas migraron hacia el polo positivo, siendo arrastradas a la salida del gel por la solución de elución.

II.4.3. Ensayo de actividad de los factores de polimerización

Para detectar la actividad del factor EF-G en las distintas fases de purificación, se utilizaron dos tipos de ensayos. En el primero, se midió la hidrólisis de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP dependiente de ribosomas y del factor EF-G, tal como se describe en el apartado III.7. Las mezclas de reacción (30 μl) llevaban 2 μl de la fracción a ensayar, utilizándose como controles mezclas con 2 μl de H_2O o de factor EF-G purificado. Todas las fracciones se ensayaron en presencia y ausencia de ribosomas con objeto de corregir la GTPasa independiente de los mismos, presente en las fracciones poco purificadas.

En el segundo ensayo de actividad se midió la formación del complejo $[\text{}^3\text{H}]\text{GDP}\cdot\text{EF-G}\cdot\text{ribosoma}\cdot\text{ac.fusídico}$ que se retiene en filtros de Nitrocelulosa (apartado III.8).

Para el ensayo de EF-T se determinó la formación del complejo $[\text{}^3\text{H}]\text{GDP}\cdot\text{EF-Tu}$ que se absorbe selectivamente en filtros de Nitrocelulosa. Las mezclas de reacción, 18 μl , contenían: KCl 55 mM, Tris-HCl (pH 7,8) 11 mM, MgAc_2 10 mM, 2-mercaptotanol 5 mM, $[\text{}^3\text{H}]\text{GDP}$ 2,6 μM (540 cpm/pmol) y 2 μl de la fracción a ensayar. Se incubaron 5 min a 30°C y después de diluir con 2 ml de una solución de la misma composición iónica que la mezcla de reacción, se filtraron a través de un filtro de Nitrocelulosa lavándose éste tres veces con 2 ml de la misma solución. Los filtros se secaron y se contaron en Tolueno-Butil PBD.

II.5. Preparación de aminoacil-tRNAs

La aminoacilación in vitro de un tRNA, con su aminoácido específico correspondiente, requiere la presencia de las aminoacil-tRNA sintetasas (específicas para cada aminoácido), ATP y un medio iónico adecuado.

Para la preparación de [^3H]Phe-tRNA utilizamos como sustrato una mezcla comercial de tRNAs de E. coli B. El resto de las preparaciones: [^{14}C] Phe-tRNA^{Phe}, [^3H] Phe-tRNA^{Phe} y [^3H] Tyr-tRNA^{Tyr} se obtuvieron a partir de tRNAs purificados de E. coli específicos para fenilalanina y para tirosina. La fuente de aminoacil-tRNA sintetasas, utilizada en la carga de tRNA mezcla, fué la fracción S100 cruda obtenida tal como se explica en el apartado II.2.2. Para la carga de tRNA^{Phe} y tRNA^{Tyr} purificados, se utilizó un S100 parcialmente purificado (apartado II.2.2.1) libre de tRNAs y aminoácidos. De esta forma, se evitó que aparecieran en la reacción de carga otras especies de aminoacil-tRNAs que contaminarían nuestra preparación.

En todos los casos, antes de realizar la carga a escala preparativa, se hicieron ensayos previos con objeto de encontrar las cantidades óptimas de S100 y tRNA para obtener el máximo rendimiento. Para ello, se utilizaron mezclas de reacción de 20 μl que contenían: NH_4Cl 100 mM, Tris-HCl (pH 7,8) 200 mM, MgAc_2 20 mM, DTT 2 mM, ATP 5 mM, CTP 0,05 mM (se añade para regenerar el extremo terminal CCA común a todos los tRNAs), el aminoácido radiactivo correspondiente a una concentración de 10-15 μM y cantidades crecientes de S100 o tRNA. Después de incubar 15 min a 30°C, la reacción se paró en hielo y en presencia de 50 μg de BSA, se precipitó con 1 ml de TCA 10% (v/v) frío.

El precipitado se separó por filtración a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/A, lavándose tres veces con 2,5 ml de TCA 5% y se determinó su radiactividad.

II.5.1. Preparación de Phe-tRNA

La mezcla de reacción (5 ml) además de los componentes anteriormente indicados, contenía: [^3H]Phe $15\text{ }\mu\text{M}$ con una actividad específica de 1840 cpm/pmol, mezcla de tRNAs $133\text{ }\mu\text{M}$ (equivalente a 3,3 mg/ml) y $170\text{ }\mu\text{l}$ de extracto S100 crudo. Después de incubar 15 min a 30°C , la reacción se detuvo añadiendo 1,25 ml de EDTA (pH 5) 0,1 M. A continuación, se desproteinizó añadiendo un volumen de fenol saturado de agua y agitando fuertemente durante 5 min a 0°C en un vortex. Las dos fases, acuosa y fenólica, se separaron por centrifugación durante 5 min a $8000\times g$ y la capa fenólica se volvió a extraer con 5 ml de H_2O . Mezcladas las dos fases acuosas obtenidas, se llevaron a 0,1 M de NaAc (pH 5) y se precipitó el tRNA con dos volúmenes de etanol absoluto a -20°C , durante 3 horas. El precipitado se separó por centrifugación 5 min a $10000\times g$ y una vez resuspendido en 5 ml de NaAc 0,1 M, se sometió a una segunda precipitación con etanol.

Con objeto de eliminar los nucleótidos y otras moléculas de bajo peso molecular, este segundo precipitado disuelto en 1 ml de solución de NaAc (pH 5) $200\text{ }\mu\text{M}$ y EDTA $50\text{ }\mu\text{M}$, se sometió a filtración en columna de Sephadex G-25 ($1,6\times 40\text{ cm}$), equilibrada con la misma solución iónica. El Phe-tRNA eluyó en el volumen excluido de la columna y se localizó midiendo la radiactividad en pequeñas alícuotas ($5\text{ }\mu\text{l}$)

de cada fracción. Las fracciones que tenían la máxima radiactividad se unieron y concentraron con Aquacida II, hasta un volumen aproximado de 2 ml, guardándose en N₂ líquido sin hidrólisis apreciable.

El rendimiento teórico obtenido fué de 416 pmol/A₂₆₀ de tRNA. Para realizar este cálculo, asumimos que de la mezcla de tRNAs utilizada, el 3% corresponde a tRNA de fenilalanina y que 1 mg/ml de tRNA equivale a 25 unidades ópticas (medidas a 260 nm) por ml.

II.5.2. Preparación de Phe-tRNA^{Phe} y Tyr-tRNA^{Tyr}

En todos los casos, la reacción de carga se realizó de manera análoga a la del Phe-tRNA. Las mezclas de reacción (2 ml), además de las condiciones iónicas y concentración de nucleótidos ya descritas, contenían tRNA^{Phe} y tRNA^{Tyr} puros, comerciales (SIGMA) a una concentración de 15 μ M y 12 μ M (6,7 y 4,3 A₂₆₀ unidades/ml) respectivamente, 100 μ l de fracción S100 parcialmente purificada y el aminoácido isotopicamente marcado a una concentración de 10 μ M, con actividad específica de 950, 1956 y 2454 cpm/pmol para [¹⁴C]Phe, [³H]Phe y [³H]Tyr respectivamente.

Las mezclas se incubaron 15 min a 30°C y después de parar la reacción, se procedió a la desproteinización con fenol tal como se ha explicado anteriormente. Como la concentración de tRNA utilizada era muy baja, prescindimos de la precipitación con etanol. La purificación del aminoacil-tRNA se realizó aplicando directamente la fase acuosa procedente de la extracción con fenol a una columna de Sephadex G-25. Las fracciones que contenían el pico de radiactividad se

reunieron y guardaron congeladas a -80°C .

II.5.3. Acetilación de Phe-tRNA^{Phe} y Tyr-tRNA^{Tyr}

La acetilación se llevó a cabo según el método descrito por Haenni y Chapeville (1966).

Se partió de 2 ml de solución de Phe-tRNA^{Phe} o Tyr-tRNA^{Tyr} radiactivos a una concentración aproximada de $2-3\ \mu\text{M}$, dependiendo de la preparación. Manteniendo la temperatura a 0°C , se añadió NaAc (pH 5) 1 M hasta una concentración final de $25\ \text{mM}$ y, a continuación, $300\ \mu\text{l}$ de anhídrido acético repartidos en tres porciones de $100\ \mu\text{l}$ cada una, que se añadieron a intervalos de 40 min. Para eliminar el ácido acético formado, la mezcla se dializó exhaustivamente frente a EDTA (pH 5) $50\ \mu\text{M}$, se concentró con Aquacida II y se conservó a -80°C .

El grado de acetilación se comprobó mediante la hidrólisis alcalina del AcPhe-tRNA y la posterior extracción en acetato de etilo a pH ácido del AcPhe formado. En estas condiciones, la fenilalanina no acetilada, no es extraíble por el disolvente y permanece en la fase acuosa.

II.6. Otros materiales

II.6.1. Preparación y purificación de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$

El $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ fué sintetizado en nuestro laboratorio por

Sonsóles Campuzano, de acuerdo con el método descrito por Glynn y Chappell (1964). La purificación se llevó a cabo por absorción del $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ en carbón activado y posterior elución con una solución de etanol-amoniaco.

II.6.2. Líquidos de centelleo

Todas las muestras radiactivas se midieron en contadores de centelleo líquido Beckman mod. LS100 e Intertechnique mod. SL30.

Para determinar la radiactividad de muestras en filtros de nitrato de celulosa, de fibra de vidrio o en papel de cromatografía, se sumergieron estos, una vez secos, en 2 ml de tolueno con 5 g/l de butil-PBD. En el caso de muestras acuosas se añadió, en la proporción de 9 a 1 con respecto a la muestra, solución de Bray (1960) que contiene 60 g de naftaleno, 5 g de butil-PBD, 100 ml de metanol y dioxano hasta 1 litro. Por último, las muestras en acetato de etilo se contaron con 2 ml de una solución compuesta por 1 litro de tolueno, 250 ml de metoxietanol y 5 g de butil-PBD.

II.6.3. Preparación de resinas para cromatografía en columna

Hemos utilizado dos tipos de resinas en las cromatografías en columna reseñadas en este capítulo: tamices moleculares, como Sephadex G-25, que separan distintas moléculas en función de su tamaño, y resinas de intercambio iónico como DEAE-Sephadex A-50 y

DEAE-celulosa (Whatman). Los geles de Sephadex G-25 se prepararon por ebullición de la resina seca con agua durante 1 hora. Para preparar DEAE-Sephadex A-50, bastó con poner la resina en solución tampón durante unas horas, lavándola a continuación varias veces con la misma solución. La DEAE-celulosa precisó de un tratamiento durante 30 min con HCl 0,5 N, seguido de otro con NaOH 0,5 N y posteriores lavados con agua hasta alcanzar un pH neutro; el último lavado de la resina se realizó con la solución tampón.

En todos los casos (antes de proceder al empaquetamiento de la columna) se eliminaron las partículas finas que permanecen en suspensión cuando ha sedimentado la mayor parte de la resina. De esta forma se consiguió aumentar el flujo de elución a través del gel.

Las columnas utilizadas, de la casa Pharmacia Fine Chemicals, se refrigeraron mediante un baño con bomba de circulación exterior a 0°C. En el caso de Sephadex G-25, Sepharosa 6B y DEAE-celulosa la elución se efectuó por gravedad, mientras que para DEAE-Sephadex A-50 la presión necesaria para la elución se suministró con una bomba peristáltica automática Pharmacia.

II.6.4. Procedencia de los productos químicos y bioquímicos.

| | |
|-------------------|------------|
| Acetato de etilo | Merck |
| Acetona | Merck |
| Acido acético | Merck |
| Acido clorhídrico | Merck |
| Acido fusídico | Farmabiión |

| | |
|---|--------------------------------|
| Acido poliuridílico | Sigma |
| Acido tricloroacético | Merck |
| Acrilamida | Merck |
| Albumina bovina (fracción V) | Sigma |
| Alúmina (Alcoa A-305) | Serva |
| Aminoácidos | Sigma |
| Aminoácidos radiactivos (Phe, Tyr, Ser, Val) | Radiochemical Centre, Amersham |
| Amoniaco | Merck |
| Anhídrido acético | Merck |
| Aquacida II | Calbiochem |
| ATP | Sigma |
| Azul de bromofenol | BDH |
| Bactotripton | Difco |
| Bluensomicina | Upjohn |
| Brij 35 | Sigma |
| Butil-PBD | Ciba-Geigy |
| Carbón activado | Merck |
| Cresol | Merck |
| CTP | Sigma |
| DEAE-celulosa (DE-23) | Whatman |
| DEAE-Sephadex-A50 | Pharmacia |
| Desoxirribonucleasa I (de pancreas bovino) | Sigma |
| Dioxano | Carlo Erba |
| Ditiotreitol | Sigma |
| Dodecylbencenosulfonato | Conejo |

| | |
|--|--------------------------------|
| Dodecil sulfato sódico | Merck |
| EDTA | Merck |
| Esparsomicina | Upjohn |
| Estreptomicina | Squibb |
| Etanol | Merck |
| Extracto de levadura | Difco |
| Fenol | Merck |
| Filtros de fibra de vidrio (GF/A, GF/B, GF/F) | Whatman |
| Filtros de nitrato de celulosa | Millipore |
| Fosfoenolpiruvato | Sigma |
| GDP | Sigma |
| GDP radiactivo | Radiochemical Centre, Amersham |
| Gentamicina C ₁ | Schering Corp. USA |
| Gentamicina C _{1a} | Schering Corp. USA |
| Glicerol | Merck |
| Glicina | Merck |
| Glucosa | Ferros |
| GppCH ₂ p | Boehringer |
| GppNHp | Boehringer |
| GTP | Sigma |
| Hidroxilapatito | Serva |
| Higromicina A | Eli Lilly and Co. |
| Higromicina B | Lilly Labs. USA |
| Kanamicina A | Bristol Labs. USA |
| Kanamicina B | Bristol Labs. USA |
| Lisozima | Sigma |

| | |
|---------------------------------|--------------------------------|
| 2-mercaptoetanol | Merck |
| Metanol | Merck |
| Metoxietanol | BDH (British Drug Houses Ltd.) |
| Naftaleno | Merck |
| Neamina | Upjohn |
| Neomicina B | Upjohn |
| Neomicina C | Upjohn |
| N-N'-metilen-bisacrilamida | Merck |
| Papel cromatografía | |
| Whatman nº1 | Whatman |
| Paromomicina | Parke-Davis |
| Piridina | Merck |
| Piruvato-kinasa, tipo II | |
| (músculo esquelético de conejo) | Sigma |
| Puromicina | Sigma |
| Puromicina radiactiva | Radiochemical Centre, Amersham |
| Riboflavina | Sigma |
| Ribostamicina | Meiji Seika Kaisha (Japón) |
| Sacarosa | Analar |
| Sales | Merck |
| Sephadex G-25 | Pharmacia |
| Sepharosa 6B | Pharmacia |
| Sisomicina | Schering Corp. USA |
| Sulfato de protamina | |
| (grado II) de salmón | Sigma |
| TEMED | Serva |
| Tetraciclina | Pfizer |

| | |
|--|----------------------|
| Tobramicina | Lilly Indiana |
| Tolueno | Ferosa |
| Tris-base | Sigma |
| tRNA de <u>E. coli</u> (mezcla) | General Biochemicals |
| tRNA de <u>E. coli</u> específico para Phe | Sigma |
| tRNA de <u>E. coli</u> específico para Tyr | Sigma |
| Tubo de diálisis Visking 8/32 | Serva |
| Verdamicina | Schering Corp. |
| Vernamicina A | Pfizer |
| Viomicina | Parke-Davis |

CAPITULO III

M E T O D O S A N A L I T I C O S

- III.1. Fijación de aminoacil-tRNAs a ribosomas
- III.2. Translocación
- III.3. Síntesis polipeptídica
- III.4. Determinación de la posición de cadenas peptídicas nacientes
- III.5. Electroforesis de alto voltaje
- III.6. Ensayo de la peptidil-transferasa
- III.7. Hidrólisis de GTP dependiente de EF-G y ribosomas
- III.8. Formación del complejo ribosoma·EF-G·GDP·ác. fusídico
- III.9. Intercambio de GDP en el complejo cuaternario
- III.10. Desprendimiento del AcPhe-tRNA previamente fijado al sitio
ribosómico A

III.1. Fijación de aminoacil-tRNAs a ribosomas

III.1.1. Técnica analítica

Para estimar la cantidad de aminoacil-tRNA fijado al sitio aceptor o donador del ribosoma (dependiendo de las condiciones elegidas), utilizamos la técnica de filtración a través de membranas de nitrocelulosa (Millipore HA, 0,45 μ). Dichos filtros retienen ribosomas libres o complejados con aminoacil-tRNA, que utilizamos isotópicamente marcado (Nirenberg y Leder, 1964).

Las mezclas de reacción se diluyeron en 2 ml de solución tampón a 0°C, de igual composición iónica que la mezcla y se filtraron por succión. El filtro se lavó dos veces con 2 ml de la misma solución y una vez seco, se determinó su radiactividad (apartado II.6.2).

III.1.2. Fijación enzimática de Phe-tRNA

La fijación enzimática de Phe-tRNA al sitio aceptor de ribosomas, programados con poli (U), requiere la presencia de los factores de polimerización EF-Tu y EF-Ts, nucleótidos de guanosina trifosfato y condiciones iónicas adecuadas.

La activación de los ribosomas, previa a la reacción de fijación, se hizo a 30°C durante 30 min en las siguientes condiciones: NH₄Cl 52 mM, KCl 38 mM, Tris-HCl (pH 7,8) 10 mM, MgAc₂ 20 mM, DTT 2,5 mM, 50-100 μ g/ml de poli(U) y 35-39 unidades ópticas de ribosomas por ml.

La fijación del $[^3\text{H}]$ Phe-tRNA se llevó a cabo en mezclas de incubación de 20-80 μl que contenían: NH_4Cl 17 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl (pH 7,8) 20 mM, MgAc_2 8,5-10 mM, ribosomas 9,2 unidades ópticas por ml. $[^3\text{H}]$ Phe-tRNA 0,26 μM , EF-T 32 $\mu\text{g/ml}$ y GTP 90 μM . La reacción comenzó con la adicción del factor, y las mezclas se incubaron a 30°C durante 45 segundos. En otras ocasiones, se sacaron de la mezcla a los tiempos indicados, alícuotas de 15 μl que se procesaron en la forma indicada en el apartado anterior.

III.1.3. Fijación enzimática de Phe-tRNA^{Phe}

Para conseguir que la fijación de $[^{14}\text{C}]$ Phe-tRNA^{Phe} ocurriera preferentemente en el sitio aceptor del ribosoma, se ocupó el sitio donador con tRNA^{Phe} desacilado. Esto se consiguió preincubando la mezcla de activación de ribosomas, durante 3 min a 30°C, a 10 mM de MgAc_2 en presencia de 60 $\mu\text{g/ml}$ de tRNA^{Phe}. La activación de ribosomas prosiguió durante 30 min a 30°C subiendo la concentración de MgAc_2 a 20 mM. Posteriormente se llevó a cabo la fijación del $[^{14}\text{C}]$ Phe-tRNA^{Phe} en forma similar a la descrita para el Phe-tRNA no purificado, en el apartado anterior.

III.1.4. Fijación enzimática de Tyr-tRNA^{Tyr}

En determinadas condiciones, el Tyr-tRNA^{Tyr} se fija al sitio aceptor de ribosomas programados con poli(U). La fijación del ami-

noácido, erroneamente codificado, requiere la presencia de un antibiótico aminoglicosídico, la hidrólisis de GTP y el factor de polimerización T.

Las mezclas de incubación, 20-300 μ l, contenían: NH_4Cl 35 mM, KCl 35 mM, MgAc_2 10 mM, Tris-HCl (pH 7,8) 20 mM, DTT 2 mM, 7,3-11,5 unidades ópticas de ribosomas programados con poli(U) con el sitio P libre o complejo con $\text{AcPhe-tRNA}^{\text{Phe}}$ (apartado III.1.5.2), 10-40 μ g de EF-T, $[^3\text{H}]\text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ 0,3-0,4 μ M, GTP 0,1 mM y el antibiótico aminoglicosídico en la concentración indicada. Las mezclas se incubaron 10 min a 30°C y la reacción se detuvo por dilución con 1-2 ml de solución tampón de igual composición iónica que la mezcla.

III.1.5. Fijación no enzimática de $\text{AcPhe-tRNA}^{\text{Phe}}$

El $\text{AcPhe-tRNA}^{\text{Phe}}$ (un análogo del peptidil-tRNA) puede fijarse al sitio aceptor (A) o donador (P) del ribosoma, siendo la preincubación de los ribosomas con tRNA desacilado y la concentración de Mg^{++} en la mezcla de reacción, los factores determinantes de la fijación a uno u otro sitio ribosómico (Watanabe, 1972).

III.1.5.1. Fijación de $\text{AcPhe-tRNA}^{\text{Phe}}$ al sitio A

Previamente a la fijación, los ribosomas se incubaron en mezclas que contenían: NH_4Cl 70 mM, KCl 80 mM, Tris-HCl (pH 7,8) 20 mM, MgAc_2 10 mM, DTT 5 mM, poli(U) 0,1 mg/ml, 52-66 unidades ópticas de

ribosomas por ml y tRNA^{Phe} 50 µg/ml. Después de 3 min a 30°C, se añadió a esta mezcla un volumen igual de una solución de Ac [¹⁴C] Phe-tRNA^{Phe}, (0,48 µM concentración final), conteniendo el suficiente MgAc₂ para que la concentración final subiera a 20 mM. La mezcla se incubó 30 min a 30°C y la reacción se detuvo por enfriamiento a 0°C. La cantidad de Ac [¹⁴C] Phe-tRNA^{Phe} fijado, se determinó por filtración a través de membranas de nitrocelulosa (apartado III.1.1). Aproximadamente, un 30-40% de los ribosomas fijaron AcPhe-tRNA al sitio ribosómico A, como se comprobó por la escasa reacción con puromicina.

III.1.5.2. Fijación de AcPhe-tRNA^{Phe} al sitio P

La reacción se llevó a cabo de forma similar a la anteriormente descrita, excepto que los ribosomas se preincubaron con poli(U) en ausencia de tRNA desacilado y la fijación de Ac [¹⁴C] Phe-tRNA^{Phe} se hizo a una concentración de MgAc₂ de 8 mM. En estas condiciones, se consiguió que el 20-25% de los ribosomas fijaran Ac [¹⁴C] Phe-tRNA^{Phe} en el sitio P, siendo nula la fijación en el sitio aceptor.

III.1.6. Purificación del complejo ribosoma·poli(U)·AcPhe-tRNA

La separación del complejo ribosoma·poli(U)·Ac [¹⁴C] Phe-tRNA de otros componentes de bajo peso molecular (tRNA desacilado, Ac [¹⁴C] Phe-tRNA libre, etc.), se realizó por filtración a través de una columna de Sepharosa 6B.

Una vez fijado el $\text{Ac}[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}$ al sitio A o P del ribosoma, las mezclas de reacción (130-240 μl) se pasaron por una columna de Sepharosa 6B (14x0,65 cm) previamente equilibrada con una solución de igual composición iónica que la de la mezcla. La elución se llevó a cabo con la misma solución tampón, recogiendo fracciones de 0,175 ml. Los complejos ribosómicos se localizaron midiendo la radiactividad de pequeñas alícuotas de cada fracción. Las fracciones que tenían la máxima radiactividad se reunieron (0,35-0,45 ml) y se determinó la concentración de ribosomas por absorción óptica a 260 nm, oscilando ésta entre 6 y 11 unidades ópticas por ml.

III.2. Translocación

III.2.1. Técnica analítica

La translocación del $\text{Ac}[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}$ o peptidil-tRNA del sitio ribosómico A al P, se determinó por el incremento en la reacción del mismo con puromicina o $[^3\text{H}]\text{puromicina}$, respectivamente, al agregar al sistema EF-G y GTP. El antibiótico puromicina es un análogo del aminoacil-adenosil 3' terminal, presente en todos los aminoacil-tRNAs, que actúa como sustrato aceptor en la formación del enlace peptídico con el sustrato donador fijado en el sitio P.

El $\text{Ac}[^{14}\text{C}]\text{Phe-puromicina}$ formado, se analizó por extracción con acetato de etilo siguiendo el método descrito por Leder y Burtsz-tyn (1966). En el caso de peptidil- $[^3\text{H}]\text{puromicina}$, el producto sintetizado se precipitó con TCA y se separó por filtración a través de

filtros de fibra de vidrio.

III.2.2. Translocación enzimática de AcPhe-tRNA

La translocación de AcPhe-tRNA dependiente de EF-G y GTP, se estudió en mezclas de reacción (20-100 μ l) que contenían: NH_4Cl 20 mM, KCl 50 mM, MgAc_2 12 mM, Tris-HCl (pH 7,8) 15 mM, DTT 1 mM, 9,5 unidades ópticas por ml de ribosomas sosteniendo 9,8 pmoles de $\text{Ac}[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}$ por unidad óptica de ribosomas previamente fijados en el sitio A (apartado III.1.5.1), 60 $\mu\text{g/ml}$ de EF-G, GTP 0,2 mM y puromicina 0,5 mM. En algunas ocasiones, el GTP se preincubó a 30°C durante 10 min en un sistema regenerante formado por fosfoenol piruvato 10 mM, piruvato-quinasa 250 $\mu\text{g/ml}$, MgAc_2 10 mM, Tris-HCl (pH 7,8) 10 mM y DTT 1 mM. La concentración final de GTP en la mezcla de translocación fué, en estos casos, de 80 μM . La reacción de translocación se llevó a cabo a 30°C durante los tiempos indicados y se paró por adición, a la mezcla total o alícuotas de la misma, de 250 μl de CO_3Na_2 (pH 10) 0,1 M.

El $\text{Ac}[^{14}\text{C}]\text{Phe-puromicina}$ sintetizado, se extrajo con 0,5 ml de acetato de etilo. Se agitó fuertemente durante 1 min, separando las fases acuosa y orgánica por centrifugación durante 3 min. Para determinar la radiactividad, a 0,4 ml de la fase orgánica, se añadió 2 ml de líquido de centelleo: tolueno y metoxietanol con Butil-PBD. Controles sin EF-G, determinaron la cantidad de $\text{Ac}[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}$ fijado en el sitio P al comienzo de la reacción. Estos valores se restaron de los resultados obtenidos.

III.2.3. Translocación del peptidil-tRNA en polisomas

La translocación del peptidil-tRNA al sitio ribosómico P, dependiente de EF-G y GTP, se estudió en mezclas de incubación (20-100 μ l) que contenían: NH_4Cl 112 mM, Tris-HCl (pH 7,8) 50 mM, MgAc_2 12,5 mM, DTT 2 mM, 10 unidades ópticas de polisomas endógenos de E. coli por ml, 60 $\mu\text{g/ml}$ de EF-G, GTP 0,2 mM y [^3H]puromicina 10 μM (Actividad específica 727 cpm/pmol). La incubación a 34°C se inició con la adición de polisomas. A los tiempos indicados, se determinó por precipitación el peptidil [^3H]puromicina formado, en la mezcla total o en alícuotas de 15 μ l. Para ello, se añadieron 100 μg de BSA y 1 ml de TCA 10%. Después de 10 min en frío, el precipitado se recogió por filtración en filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/F o GF/B). Los filtros se lavaron cuatro veces con 2,5 ml de TCA 5% y 3 veces con 5 ml de etanol y, una vez secos, se determinó su radiactividad.

Se llevaron, en paralelo, controles sin EF-G ni GTP (para determinar el peptidil-tRNA situado en el sitio P al comienzo de la incubación), así como controles sin polisomas que estimaron la retención inespecífica de [^3H]puromicina en los filtros.

III.3. Síntesis polipeptídica

Hemos estudiado la síntesis in vitro de cadenas polipeptídicas utilizando dos tipos de RNA mensajero: el ácido poliuridílico, un homopolímero sintético que dirige la síntesis de polifenilalanina en ribosomas y el mensajero natural de polisomas endógenos de E. coli.

III.3.1. Síntesis de polifenilalanina

La síntesis enzimática de polifenilalanina requiere la presencia de ribosomas, poli(U), factores de polimerización puros o extracto S100, fenilalanina, tRNA y nucleótidos de guanosina trifosfato, en un ambiente iónico adecuado.

A) Cuando se utilizó S100 como fuente de factores y aminoacil-tRNA sintetasas, la síntesis se llevó a cabo en mezclas de incubación (20-240 μ l) que contenían: NH_4Cl 60 mM, MgAc_2 12,7 mM, Tris-HCl (pH 7,8) 50 mM, DTT 2 mM, 9,8 unidades ópticas por ml de ribosomas preincubados con poli(U), 0,5 mg/ml de mezcla de tRNAs de E. coli, fosfoenolpiruvato 10 mM, piruvato-kinasa 60 μ g/ml, ATP 2 mM, GTP 0,25 mM, un 5% en volumen de extracto S100 y $[^3\text{H}]$ Phe 20 μ M, con una actividad específica comprendida entre 160-380 cpm/pmol. Después de incubar a 30°C durante los tiempos indicados, se detuvo la reacción añadiendo 50 μ g de BSA (como agente floculante) y 1 ml de TCA 10% frío. A continuación, se hidrolizó el aminoacil-tRNA y el peptidil-tRNA en el precipitado, calentando a 90°C durante 15 min y se filtró a través de membranas de fibra de vidrio GF/A, lavando los filtros tres veces con 2,5 ml de TCA 5%.

Dado que las moléculas de fenilalanina pasan a través de estos filtros, toda la radiactividad retenida en los mismos, correspondía a las cadenas de polifenilalanina sintetizadas. Los valores obtenidos en controles sin poli(U) o a tiempo 0 min de incubación, se restaron de los resultados.

B) Para estudiar la síntesis de polifenilalanina con factores de polimerización purificados se partió de ribosomas con $\text{Ac}[^{14}\text{C}]$ Phe-tRNA

fijado en el sitio A (apartado III.1.5.1) como iniciador.

Las mezclas de reacción (20 μ l) contenían: NH_4Cl 25 mM, KCl 45 mM, MgAc_2 13 mM, Tris-HCl (pH 7,8) 20 mM, 9,7 unidades ópticas por ml de ribosomas conteniendo 10,8 pmoles de $\text{Ac} [^{14}\text{C}] \text{Phe-tRNA}$ por unidad óptica de ribosomas, GTP 80 μM , PEP 1 mM, PK 25 $\mu\text{g/ml}$, EF-T 90 $\mu\text{g/ml}$, EF-G 120 $\mu\text{g/ml}$ y $[^3\text{H}] \text{Phe-tRNA}$ 0,36 μM (1320 cpm/pmol). Después de incubar 4 min a 30°C se detuvo la reacción, determinándose el material radiactivo precipitable en TCA caliente, tal como se ha descrito anteriormente.

III.3.2. Síntesis no enzimática de polifenilalanina

En determinadas condiciones, la síntesis no enzimática de polifenilalanina puede tener lugar en ribosomas programados con poli(U) (Pestka, 1968; Gavrilova y Spirin, 1971). Esta síntesis, en ausencia de factores de polimerización, se estimula con el reactivo de los grupos sulfhidrilo para-cloromercuribenzoato (PCMB) (Gavrilova y Spirin, 1971).

La reacción se llevó a cabo en mezclas de 40 μ l de la siguiente composición: KCl 106 mM, Tris-HCl (pH 7,8) 10 mM, MgAc_2 15 mM, ribosomas no activados previamente 6,4 unidades ópticas por ml, poli(U) 100 $\mu\text{g/ml}$, $[^3\text{H}] \text{Phe-tRNA}$ 0,52 μM con una actividad específica de 1660 cpm/pmol y PCMB 0,1 mM. Las mezclas se incubaron a 25°C durante 2 horas. Después de parar la reacción con BSA y TCA 10% frío, se determinó la cantidad de polifenilalanina sintetizada, de la forma ya descrita (apartado III.3.1).

III.3.3. Síntesis de proteínas en polisomas endógenos

Hemos estudiado la incorporación de aminoácidos en las cadenas nascentes de polisomas de E. coli dirigida por su propio RNA mensajero. Utilizamos ^{14}C -valina como aminoácido marcador y extracto S100 como fuente de factores y aminoacil-tRNA sintetisas.

Las mezclas de incubación (20-220 μl) contenían: NH_4Cl 115 mM, MgAc_2 13 mM, Tris-HCl (pH 7,8) 56 mM, DTT 2 mM, 10,4 unidades ópticas de polisomas por ml, mezcla de tRNAs 0,2 mg/ml, ^{14}C -valina 30 μM (51 cpm/pmol), los restantes 19 aminoácidos no marcados isotópicamente 60 μM cada uno, fosfoenol piruvato 12,5 mM, piruvato-kinasa 75 $\mu\text{g/ml}$, ATP 25 mM, GTP 0,3 mM y 5% en volumen de fracción S100. La incorporación comenzó con la adición de polisomas. Después de incubar a 34°C durante los tiempos indicados, se detuvo la reacción en la mezcla total o en alícuotas de 15 μl de la misma, determinándose la radiactividad precipitable en TCA caliente (ver apartado III.3.1). La radiactividad retenida en los filtros correspondientes a controles sin polisomas, se restó de los valores obtenidos.

Para estimar el número de aminoácidos totales incorporados en las cadenas, se asumió que el producto sintetizado tiene el mismo contenido en valina que la proteína total de E. coli, es decir, 5,5% (Roberts y cols., 1955).

III.4. Determinación de la posición de cadenas polipeptídicas nacientes

En un sistema completo de síntesis de proteínas, la adición de determinados antibióticos puede dar lugar al bloqueo de las cadenas polipeptídicas nacientes, bien en el sitio A o en el P del ribosoma. Para determinar la posición de estas cadenas en ribosomas y polisomas bloqueados durante la síntesis utilizamos el antibiótico puromicina, que reacciona exclusivamente con las cadenas situadas en el sitio P. El peptidil-puromicina formado, se analizó por precipitación con TCA o m-cresol.

III.4.1. Bloqueo de la síntesis de proteínas en polisomas endógenos

La síntesis de proteínas en polisomas se llevó a cabo tal como se describe en el apartado III.3.3, excepto que ninguno de los 20 aminoácidos utilizados estaba isotopicamente marcado. Las mezclas de reacción (20-160 μ l) se incubaron a 34°C durante 3-6 min y la síntesis se bloqueó por la adición del antibiótico que se especifique en Resultados. Después de 1 min (tiempo suficiente para la fijación del antibiótico al ribosoma), se añadieron 2-16 μ l de [3 H] puromicina 100 μ M, continuando la incubación durante 2 min o el tiempo que se indique. Para detener la reacción y analizar el peptidil- $^{[3}\text{H}]$ puromicina sintetizado, se procedió de la forma descrita en el apartado III.2.4. Los valores obtenidos en controles sin polisomas se restaron de todos los resultados.

III.4.2. Bloqueo de la síntesis de polifenilalanina en ribosomas

La síntesis de polifenilalanina en ribosomas dirigidos por poli(U), con extracto S100 como fuente de factores, se realizó en mezclas de incubación (560 μ l) de igual composición a la descrita en el apartado III.3.1a. A los 4-5 min de incubación se añadieron a alícuotas de 150 μ l de la mezcla, los antibióticos que se especifiquen (1-4 μ l), continuando la incubación a 30°C durante 2 min. Pasado este tiempo, se añadió a cada alícuota puromicina a una concentración final de 30 μ M. A los tiempos indicados se detuvo la reacción de la puromicina en alícuotas de 20 μ l, mediante la adición de 2 ml de m-cresol. Se filtró por succión a través de filtros de fibra de vidrio GF/F lavando dos veces con 2 ml de m-cresol y tres veces con 5 ml de etanol. Una vez secos, los filtros se contaron con tolueno-butyl PBD.

El [3 H]Phe-tRNA y polifenilalanil-tRNA (libres o unidos a ribosomas) son insolubles en cresol y se retienen en los filtros, mientras que cadenas libres de polifenilalanina y polifenilalanil-puromicina son solubles y pasan a través de los mismos (Maden y Monro, 1967).

Para controlar la síntesis de polifenilalanina a lo largo de todo el proceso, se sacaron a los tiempos que se indiquen alícuotas de 20 μ l de la mezcla de reacción incubada en ausencia de antibióticos, analizándose la radiactividad precipitable en m-cresol.

Cuando el bloqueo de la síntesis de polifenilalanina se llevó a cabo en un sistema con factores de polimerización purificados (apartado III.3.1b), la determinación de la posición de las cadenas nacientes se realizó de forma similar a la anteriormente expuesta. En

este caso, el $[^3\text{H}]$ peptidil-puromicina sintetizado, se analizó en alícuotas de $15\ \mu\text{l}$ por extracción, a pH 5, con acetato de etilo (ver apartado III.2.2).

III.5. Síntesis de $\text{AcPhe}-(\text{aa})_{n+1}$ -tRNA. Análisis de los productos sintetizados por electroforesis de alto voltaje

La longitud y naturaleza de las cadenas peptídicas sintetizadas en un sistema de síntesis dirigido por poli(U), con aminoácidos correcta (fenilalanina) e incorrectamente codificados (tirosina), se estudió utilizando la técnica de electroforesis de alto voltaje. Dicha técnica permite, en condiciones adecuadas, la separación de aminoácidos, péptidos y oligopéptidos de pequeño tamaño con un buen grado de resolución.

Se partió de ribosomas con $\text{Ac}[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ fijado directamente al sitio P (apartado III.1.5.2) o bien al sitio A y posteriormente translocado en presencia de G y GTP, aislando el complejo poli(U)·ribosoma,AcPhe-tRNA por filtración a través de columna de Sepharosa 6B. La fijación de $[^3\text{H}]\text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ y $[^3\text{H}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ se llevó a cabo en dos mezclas iguales ($100\text{-}400\ \mu\text{l}$) que contenían: NH_4Cl 37 mM, KCl 33 mM, MgAc_2 10 mM, Tris-HCl (pH 7,8) 20 mM, DTT 2 mM, GTP $100\ \mu\text{M}$, PEP 1 mM, PK $25\ \mu\text{g/ml}$, 7,3 unidades ópticas por ml de ribosomas que contenían en el sitio P 5,5 pmoles de AcPhe-tRNA por unidad óptica de ribosomas, estreptomycin o viomicina $5\text{-}10\ \mu\text{M}$, EF-T $10\ \mu\text{g/ml}$ y $[^3\text{H}]\text{Tyr-tRNA}$ o $[^3\text{H}]\text{Phe-tRNA}$ $0,25\ \mu\text{M}$. Después de 10 min a 30°C , se detuvo la reacción o bien continuó durante 5 min más en presencia del

factor EF-G (80-300 $\mu\text{g/ml}$) y cuando se indique, puromicina 500 μM . La reacción se detuvo diluyendo la mezcla o alícuotas (100-160 μl) de la misma en 1,5 ml de solución tampón de igual composición iónica e inmediatamente se filtró por succión a través de dos membranas de nitrocelulosa, recogiendo la solución de filtrado; la radiactividad de los filtros, así como la de una porción de la solución de filtrado, se determinó por el método usual de conteo.

Dado que gran parte del AcPhe-(Tyr)_n-tRNA sintetizado se desprende del ribosoma durante la incubación, procesamos por separado el peptidil-tRNA unido a ribosomas, que a su vez son retenidos en las membranas, y las cadenas peptídicas presentes en la solución de filtrado. Los procedimientos previos a la electroforesis se detallan a continuación.

Los filtros Millipore se trataron dos veces con 1 ml de NH_4OH 1 N para extraer los ribosomas y productos fijados a los mismos. El extracto se evaporó a sequedad en un rotavapor. El residuo obtenido se disolvió en 400 μl de NaOH 0,5 N, incubándose a 37°C durante 1 hora para hidrolizar el peptidil-tRNA (Ono y cols., 1969). Después de acidificar el hidrolizado con 25 μl de HCl 12,5 N, los péptidos se extrajeron con 1 ml de acetato de etilo. La fase orgánica, aproximadamente 800 μl , se evaporó a sequedad bajo corriente de aire y el residuo se disolvió en 25 μl de fenol.

Por otra parte, el peptidil-tRNA de la solución de filtrado (1150 μl) se hidrolizó incubando 1 hora a 37°C en presencia de 125 μl de NaOH 5N. La solución se acidificó con HCl y los péptidos se extrajeron dos veces con 1 ml de acetato de etilo, siguiendo el mismo proceso que en el caso anterior.

Las muestras disueltas en fenol, se aplicaron en pequeñas porciones en tiras (3x65 cm) de papel Whatman nº 1. Las tiras previamente humedecidas con una solución tampón de NH_4Ac (pH 6,9) 0,1 M, se sometieron a electroforesis durante 1 hora a 50 voltios por cm. En estas condiciones las cadenas peptídicas migran hacia el ánodo las siguientes distancias: acetyl-fenilalanina 25 cm, dipéptidos (acetyl-difenilalanina o acetyl-fenilalanil-tirosina) 17 cm, tripéptidos 14 cm, cuatripéptidos 11 cm y polipéptidos de mayor tamaño permanecen en el origen o muy cerca de él. Las tiras, una vez secas, se cortaron transversalmente en trozos de 1 cm de ancho que se contaron con 2 ml de tolueno-butyl PBD, seleccionando el canal adecuado para cada isótopo (^{14}C y ^3H).

Cuando el producto a analizar por la técnica de electroforesis fué peptidil-puromicina, la electroforesis se realizó durante 2 horas a 61 voltios por cm en una solución formada por ácido acético 5% (v/v) y piridina 0,5% (pH 3,5). En estas condiciones el movimiento de los productos hacia el cátodo fué el siguiente: acetyl-fenilalanil-puromicina 23 cm, dipeptidil-puromicina 16 cm, tripeptidil-puromicina 11 cm y el resto de las cadenas próximas al origen.

III.6. Ensayo de peptidil-transferasa

Para determinar la actividad de la peptidil-transferasa hemos utilizado el antibiótico puromicina, que forma enlace peptídico con el aminoacyl-tRNA situado en el sitio P del ribosoma (Nathans, 1964).

La reacción se llevó a cabo en mezclas de incubación 90-150 μ l, de la misma composición que la descrita para translocación (apartado III.2.2) pero sin puromicina. Después de incubar 5 min a 30°C, (tiempo suficiente para que el AcPhe-tRNA fijado, translocara al sitioP) se sacaron alícuotas de la mezcla 15-40 μ l y se les añadió puromicina a una concentración final de 500 μ M. La incubación a 30°C prosiguió durante 2 min o el tiempo que se indique. La reacción se detuvo con 250 μ l de CO_3Na_2 0,1 M y el Ac [^{14}C] Phe-puromicina sintetizado se extrajo con acetato de etilo, tal como se explica en el apartado III.2.2.

III.7. Hidrólisis de GTP dependiente de EF-G y ribosomas

La actividad GTPásica dependiente del factor de polimerización G y ribosomas, se analizó en mezclas de incubación de 20 μ l que contenían: NH_4Cl 70 mM, MgAc_2 11 mM, Tris-HCl (pH 7,8) 16 mM, DTT 1 mM, ribosomas activados 9,5 unidades ópticas por ml, EF-G 60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y [γ - ^{32}P]GTP 92 μM (3,6 cpm/pmol) previamente incubado con fosfoenol piruvato y piruvato-kinasa para eliminar el GDP contaminante de la preparación. Las mezclas de reacción se incubaron 7 min a 30°C y el $^{32}\text{P}_i$ liberado se determinó siguiendo el procedimiento descrito por Brot y cols. (1971), con algunas modificaciones. Para ello, se añadieron a las mezclas 150 μ l de ácido perclórico 0,7 M que contenía $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 2,5 mM y carbón activado 4% (p/v). Se centrifugó 5 min a 5000xg para sedimentar el carbón y el precipitado protéico, y del sobrenadante se sacaron 150 μ l que se contaron con 2 ml de líquido de centelleo

de Bray. El GTP y el GDP se adsorben en el carbón activado, pero no así el P_i libre.

Los resultados obtenidos se corrigieron por el $^{32}P_i$ libre presente en la preparación de $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{GTP}$ (aproximadamente el 6%). Los controles de la hidrólisis de GTP debida solo a ribosomas o a EF-G, resultaron despreciables.

III.8. Formación del complejo GDP·EF-G·ribosoma·ácido fusídico

El factor EF-G, en presencia de GDP y ácido fusídico, forma complejos estables con ribosomas (Bodley y cols., 1969). Estos complejos se retienen en filtros de nitrocelulosa y pueden ser fácilmente cuantificados utilizando $[^3H]\text{GDP}$.

Las mezclas de reacción (20 μl) contenían: NH_4Cl 17 mM, Tris-HCl (pH 7,8) 10 mM, MgAc_2 10 mM, DTT 1 mM, ribosomas previamente activados 10,2 unidades ópticas por ml, 60 $\mu\text{g/ml}$ de EF-G, $[^3H]\text{GDP}$ 5 μM (2460 cpm/pmol) y ácido fusídico 2,5 mM. La incubación durante 20 min a 30°C, se detuvo por la adición de 2 ml de una solución de igual composición iónica que la mezcla y que contenía, además, ácido fusídico 0,5 mM. La ausencia de ácido fusídico de la solución de lavado produce la rotura del complejo durante el proceso de filtración (Bodley y cols., 1970a). Los filtros se lavaron dos veces con 2 ml de la misma solución y se determinó su radiactividad. Controles sin EF-G se llevaron en paralelo y su valor se restó de los resultados obtenidos.

III.9. Intercambio de GDP en el complejo cuaternario

Los complejos GDP·EF-G·ribosoma·ácido fusídico son consecuencia de estados de equilibrio, existiendo una reversibilidad entre el estado libre y el estado asociado de sus componentes. Se puede obtener una medida aproximada de esta reversibilidad mediante experimentos en los que una vez formado el complejo cuaternario con [^3H]GDP, se hace disminuir su actividad específica hasta que resulte despreciable, por la adición de un gran exceso de GDP no marcado.

El experimento se llevó a cabo añadiendo a una mezcla de reacción de 100 μl que contenía los complejos [^3H]GDP·EF-G·ribosoma·ácido fusídico, formados tal como se indica en el apartado III.8, la cantidad necesaria de solución de GDP no marcado, para que la concentración final de este compuesto fuera 0,5 mM. Se incubó a 30°C y a los tiempos indicados, se determinó en alícuotas de 15 μl la cantidad de [^3H]GDP fijado a los ribosomas, por la técnica de filtración a través de filtros de nitrocelulosa (ver apartado anterior).

III.10. Desprendimiento del AcPhe-tRNA fijado en el sitio ribosómico A

El AcPhe-tRNA fijado al sitio aceptor(A) del ribosoma se desprende del mismo al incubar el complejo ribosoma·AcPhe-tRNA a bajas concentraciones de ión NH_4^+ (Watanabe, 1972).

Para estudiar este desprendimiento, se fijó Ac [^{14}C] Phe-tRNA a ribosomas en las condiciones descritas en el apartado III.1.5.1,

utilizando una concentración de NH_4Cl de 40 mM. Pequeñas porciones de esta mezcla (5 μl) se diluyeron con siete volúmenes de una solución tampón carente de iones NH_4 . Las concentraciones finales obtenidas fueron: NH_4Cl 5 mM, MgAc_2 13 mM, Tris-HCl (pH 7,8) 13 mM, DTT 1 mM y 5,7 unidades ópticas de ribosomas por ml conteniendo 8 pmol de AcPhe-tRNA por unidad óptica de ribosomas. Las mezclas se incubaron a 37°C durante 10 min y se analizaron por filtración en membrana de nitrocelulosa, utilizando una solución tampón de la misma composición iónica que la mezcla.

CAPITULO IV

R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N

- IV.1. Efecto de la higromicina B en la síntesis de proteínas. Modo de acción
- IV.2. Efecto de los antibióticos aminoglicosídicos en el ciclo de polimerización de las cadenas peptídicas
- IV.3. Incorporación en cadenas peptídicas del Tyr-tRNA^{Tyr}, fijado a ribosomas programados con poli(U)

IV.1. Efecto de la higromicina B en la síntesis de proteínas. Modo de acción.

IV.1.1. Introducción

La higromicina B es un antibiótico aminoglicosídico cuya estructura química se ha elucidado recientemente (Neuss y cols., 1970). Este antibiótico presenta en su estructura unas propiedades claramente diferentes de las de otros aminoglicosídicos. Contiene ácido destómico, D-talosa y un anillo de N-metil-2 deoxiestreptamina llamado hiosamina (ver Figura 1.5).

En el momento de comenzar el presente trabajo, el modo de acción de la higromicina B en la síntesis de proteínas era poco conocido. Los estudios realizados por otros autores demostraban que la higromicina B, al igual que otros antibióticos aminoglicosídicos mejor caracterizados (estreptomicina, kanamicina, neomicina, etc....), inducía errores en la lectura del RNA mensajero, en un sistema de síntesis in vitro dirigido por homopolinucleótidos sintéticos (Davies y cols., 1965; Davies y Davis, 1968). Consecuentemente, se asumió que la higromicina B inhibía la síntesis polipeptídica interfiriendo con la etapa de reconocimiento del aminoacil-tRNA.

Decidimos investigar, más profundamente, el efecto de este antibiótico en otras reacciones implicadas en el proceso de la síntesis protéica y concretamente en aquellas que dan lugar a la polimerización de la cadena peptídica.

IV.1.2. Sensibilidad de la polimerización de la cadena polipeptídica a la higromicina B.

El efecto de la higromicina B en el alargamiento de las cadenas peptídicas, se estudió en dos tipos de sistemas, en uno de los cuales la síntesis era dirigida por RNA mensajero natural y en el otro por ácido poliuridílico (un homopolinucleótido sintético que codifica la síntesis de polifenilalanina).

IV.1.2.1. Sistema de síntesis polipeptídica dirigido por RNA mensajero natural.

Los polisomas endógenos purificados de E. coli suplementados con extracto S100, aminoácidos, tRNA, GTP y ATP, constituyen un sistema muy adecuado para el estudio de la polimerización de las cadenas peptídicas, dirigida por RNA mensajero natural. Como este sistema carece de subunidades ribosómicas y de factores de iniciación, no tiene lugar en él la iniciación de la síntesis de proteínas sino simplemente el alargamiento de las cadenas nacientes (Tai y cols., 1973).

La sensibilidad de este sistema de síntesis a cantidades crecientes de higromicina B se muestra en la Figura 4.1 (O), en la que se observa que una concentración de 2-3 μM de higromicina B es suficiente para inhibir el 50% de la síntesis, obteniéndose el máximo efecto (aproximadamente el 90% de inhibición) a una concentración de 20 μM .

El 100% de actividad en esta gráfica correspondió a una incorporación de 540 aminoácidos por unidad óptica de ribosomas (en au-

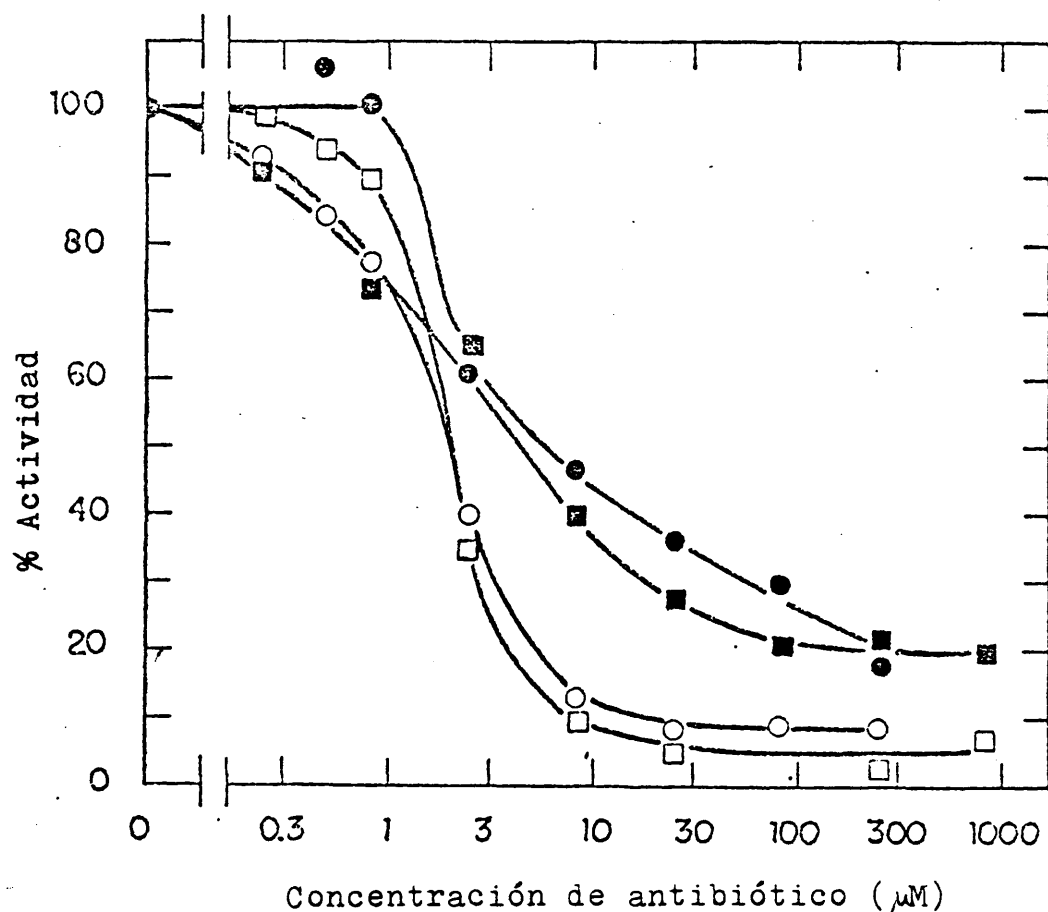


Figura 4.1.- Inhibición por la higromicina B de la síntesis polipeptídica en polisomas endógenos de *E. coli* (O) o en los complejos Ac [¹⁴C] Phe-tRNA·ribosoma·poli(U) (□) y de la reacción, dependiente de EF-G y GTP, del peptidil-tRNA con [³H] puromicina (●) o del Ac [¹⁴C] Phe-tRNA con puromicina (■). Los experimentos en ambos sistemas se llevaron a cabo en mezclas de reacción de 20 μl como se describe en Métodos (apartados III.4, III.3.1b, III.2.3 y III.2.2, respectivamente). Los tiempos de incubación fueron 15 min (O), 4 min (□), 3 min (●) y 2 min (■). El 100% de actividad en la reacción con puromicina, representa 4 pmol de Ac [¹⁴C]-Phe-puromicina o bien 8,8 pmol de peptidil- [³H] puromicina, sintetizado por A₂₆₀ de ribosomas.

sencia del antibiótico), deducida a partir de la incorporación de [^{14}C]valina, presente en la mezcla de reacción, tal como se indica en el apartado III.3.3.

IV.1.2.2. Síntesis de polifenilalanina dirigida por ácido poliurídico

Seguidamente estudiamos el efecto de distintas concentraciones de higromicina B en la síntesis de polifenilalanina dirigida por poli(U), en un sistema altamente purificado que contenía: ribosomas lavados a los que previamente se había fijado $\text{Ac}[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}$ en el sitio A como iniciador de la cadena, [^3H] Phe-tRNA , GTP (incubado durante 10 min en un sistema regenerante de energía compuesto por PEP y PK, tal como se indica en el apartado III.2.2), y los factores de polimerización G y T, purificados. Este sistema, menos activo que el sistema de síntesis con polisomas endógenos, sintetiza principalmente N-acetil-oligopéptidos.

La Figura 4.1 (□) muestra los resultados obtenidos en un experimento en que en el control sin antibiótico (100% de actividad) se obtuvo una incorporación de 25 pmol de fenilalanina por unidad óptica de ribosomas. La curva de inhibición obtenida en este sistema purificado fué sensiblemente parecida a la obtenida en el sistema de síntesis dirigido por mensajero natural (Figura 4.1 (O)).

Comprobamos, por último, el efecto de la higromicina B en la síntesis de polifenilalanina, en un sistema más crudo constituido por ribosomas lavados, poli(U), extracto S100 (como fuente de facto-

res de polimerización y de aminoacil-tRNA sintetisas), GTP, ATP, tRNA y $[^3\text{H}]$ fenilalanina. En paralelo y en el mismo sistema estudiamos la incorporación, estimulada por el antibiótico, de un aminoácido erróneamente codificado por el mensajero. Utilizamos como aminoácido erróneo, la $[^{14}\text{C}]$ serina, que viene codificada por el triplete UCU (entre otros). Trabajos anteriores de otros autores (Davies y cols., 1965) demostraban que la incorporación de este aminoácido era fuertemente estimulada por la higromicina B, en un sistema de síntesis programado por ácido poliuridílico.

El ensayo se llevó a cabo en dos mezclas de reacción semejantes salvo que en una de ellas estaban presentes simultáneamente los dos aminoácidos, $[^3\text{H}]$ Phe y $[^{14}\text{C}]$ ser, mientras que en la otra mezcla se omitió el aminoácido no codificado $[^{14}\text{C}]$ ser. La Figura 4.2 muestra el efecto de concentraciones crecientes de higromicina B en la incorporación de ambos aminoácidos en cadenas peptídicas precipitables en TCA caliente. En primer lugar, podemos observar que la síntesis polipeptídica en este sistema es menos sensible al antibiótico que la síntesis dirigida por mensajero natural o por poli(U) en un sistema altamente purificado.

Efectivamente, la máxima inhibición en el sistema crudo dirigido por poli(U) (aproximadamente un 80%) se alcanza a una concentración de $30\ \mu\text{M}$, mientras que concentraciones de $3\text{-}5\ \mu\text{M}$ del antibiótico ocasionan una inhibición de la incorporación de fenilalanina del 50% tanto en presencia (O) como en ausencia (\square) de serina. Al mismo tiempo, la estimulación de la incorporación de la $[^{14}\text{C}]$ serina comienza a una concentración del antibiótico menor de $3\ \mu\text{M}$ y se incrementa casi linealmente hasta la máxima concentración usada, $0,24\ \text{mM}$ de hi-

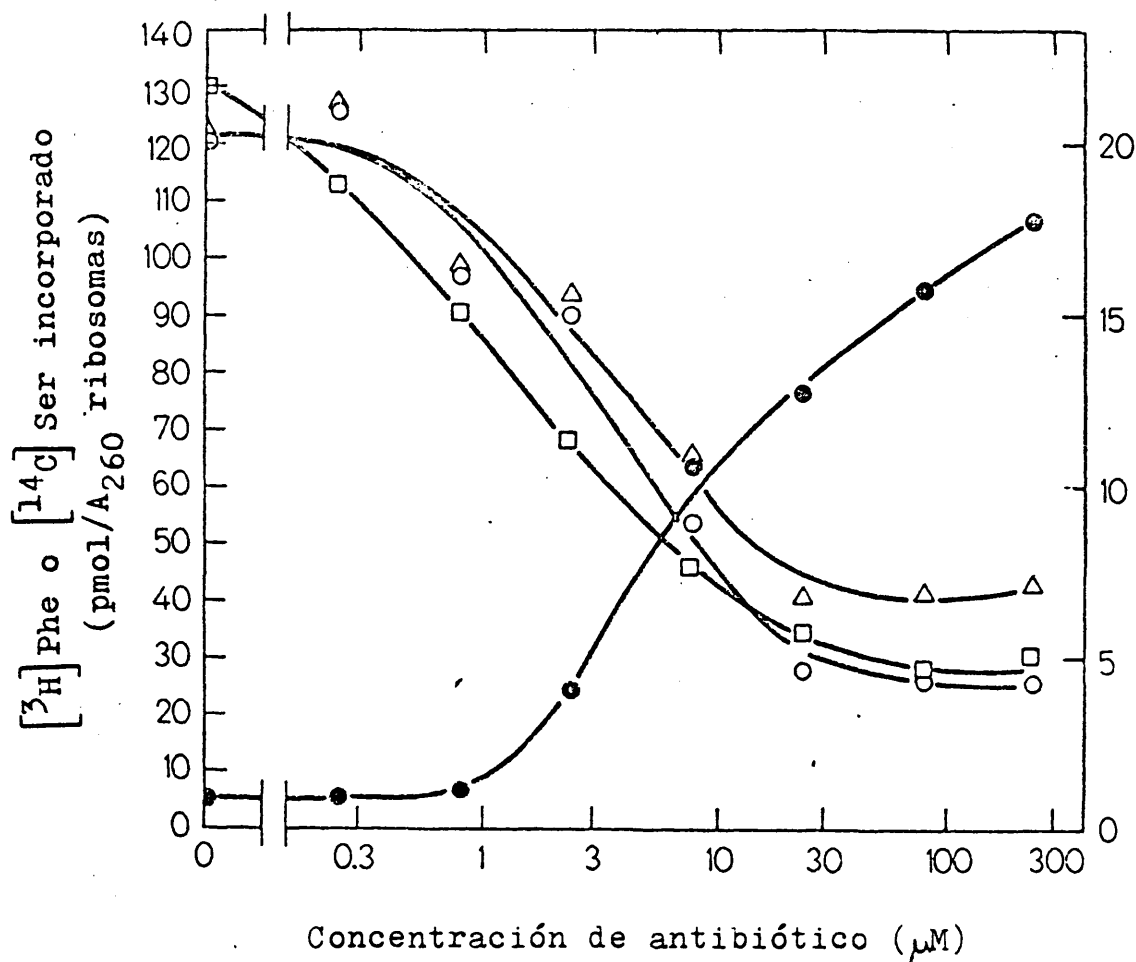


Figura 4.2.- Efecto de la concentración de higromicina B en la incorporación dirigida por poli(U) de [³H]fenilalanina (○, □) y [¹⁴C]serina (●) en cadenas polipeptídicas. La síntesis se realizó como se detalla en III.3.1a, en mezclas de reacción de 20 μl que se incubaron 12 min. En la mitad de estas mezclas estaban presentes [³H]Phe (380 cpm/pmol) y [¹⁴C]ser (200 cpm/pmol) simultáneamente (○, Δ), mientras que en las otras se omitió la serina (□). (Δ) representa la suma de [³H]fenilalanina y [¹⁴C]serina incorporadas. Controles de la incorporación en ausencia de poli(U) (2,1 pmol de [³H]Phe y 2,9 pmol de [¹⁴C]ser/A₂₆₀ ribosomas) se restaron de todos los valores obtenidos.

gromicina B (●). Por otra parte, en esta Figura tambien podemos observar que la omisión de la [^{14}C]serina de la mezcla de reacción, no modifica sustancialmente la cantidad de [^3H]fenilalanina incorporada en presencia del antibiótico. Este resultado inesperado parece indicar que la incorporación del aminoácido, erróneamente codificado por el mensajero, no reemplaza a la del aminoácido correcto sino que tiene lugar en adición a ésta. En consecuencia, si consideramos el total de aminoácidos incorporados (es decir, la suma de [^3H]fenilalanina y [^{14}C]serina), la inhibición de la síntesis polipeptídica a altas concentraciones de la higromicina B (superiores a 30 μM) es menor cuando la [^{14}C]serina está presente en la mezcla de reacción (Δ) que cuando no lo está (\square); la inhibición de la incorporación total de aminoácidos a la concentración de 0,24 mM del antibiótico, es del 65% en el primero de los casos y alcanza hasta un 80% en el segundo.

En este mismo sistema de síntesis de polifenilalanina decidimos investigar el efecto que causaba el antibiótico en la incorporación de fenilalanina y de serina, cuando se añadía a la mezcla de reacción una vez comenzada la síntesis polipeptídica. En la Figura 4.3 se observa que la adición de 0,24 mM de higromicina B a una alícuota de la mezcla de síntesis que lleva 4,5 min sintetizando activamente, conduce a una fuerte inhibición de la síntesis de polifenilalanina (●) mientras que se estimula considerablemente la incorporación de la serina en las cadenas polipeptídicas (■).

Los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, demostraron claramente que la higromicina B inhibe activamente el ciclo de polimerización de la cadena peptídica en todos los sistemas ensayados y confirmaban los trabajos anteriores indicando que producía

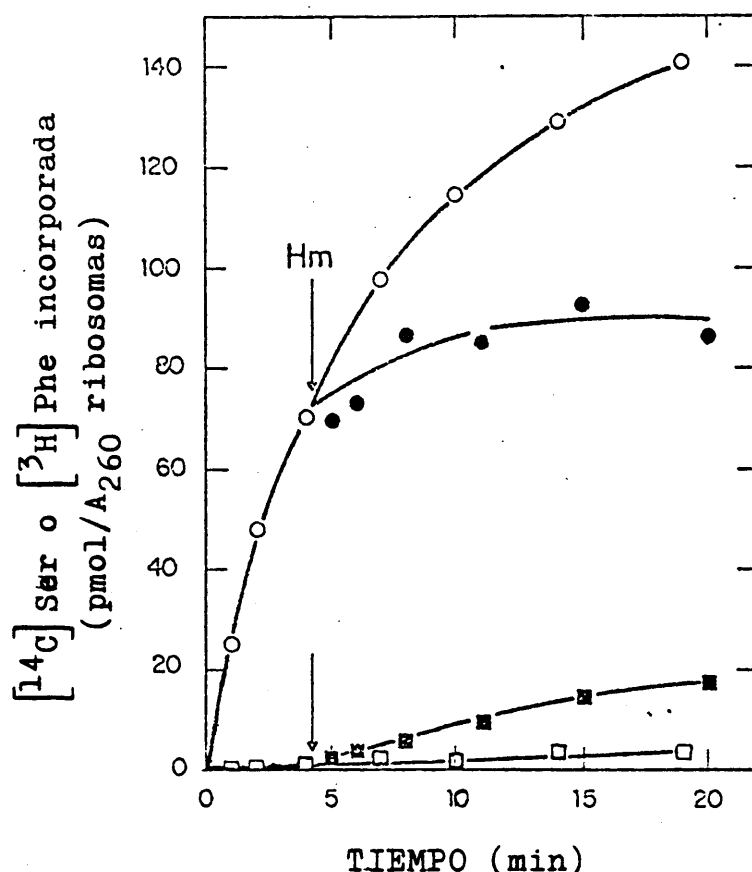


Figura 4.3.- Efecto de la higromicina B (0,24 mM) en la incorporación de [³H]fenilalanina (O,●) y [¹⁴C]serina (□,■) en un sistema de síntesis polipeptídico dirigido por poli(U). El experimento se llevó a cabo como en III.3.1a, en una mezcla de reacción de 240 μl, que contenía además de [³H]Phe (160 cpm/pmol), [¹⁴C]ser (200 cpm/pmol) (O,□). En el tiempo indicado por la flecha se añadió a una porción de la mezcla (100 μl) 3 μl de higromicina B 8 mM, prosiguiendo la incubación a 30°C (●,■). A los tiempos indicados en la Figura se determinó la incorporación de ambos aminoácidos en alícuotas de 15 μl de las mezclas. El valor obtenido a 0 min de incubación, se restó de los resultados.

errores en la traducción del mRNA (Davies y cols., 1965; Davies y Davis, 1968). El siguiente propósito de nuestro trabajo fué averiguar que etapa o etapas de dicho ciclo eran las afectadas por el antibiótico y responsables, en consecuencia, de la inhibición observada. Como ya apuntamos en el capítulo de Introducción (apartado I.1.3) podemos dividir la polimerización del polipéptido en tres etapas bien diferenciadas: la fijación del aminoacil-tRNA al sitio A, la formación del enlace peptídico con el peptidil-tRNA situado en el sitio P y la translocación del peptidil-tRNA formado. Ensayamos, por tanto, el efecto de la higromicina B en cada una de estas etapas en sistemas modelos simplificados.

IV.1.3. Efecto de la higromicina B en la fijación enzimática de $[^3\text{H}]$ Phe-tRNA

En primer lugar estudiamos el efecto del antibiótico en la fijación de $[^3\text{H}]$ Phe-tRNA a ribosomas programados con ácido poliuridílico. A bajas concentraciones de Mg^{++} (entre 6 y 10 mM) esta fijación, que depende del factor de polimerización T y de GTP, tiene lugar preferentemente en el sitio ribosómico A y resulta un buen índice de las posibles interferencias del antibiótico con la fijación del aminoacil-tRNA. Para evitar la escasa, aunque posible, fijación de $[^3\text{H}]$ Phe-tRNA al sitio P, que distorsionaría nuestros resultados, ocupamos en primer lugar este sitio ribosómico: para ello los ribosomas (previamente a la reacción de fijación) se incubaron con tRNA desacilado el cual, a 10 mM de Mg^{++} se fija preferentemente en el sitio P (Watanabe, 1972).

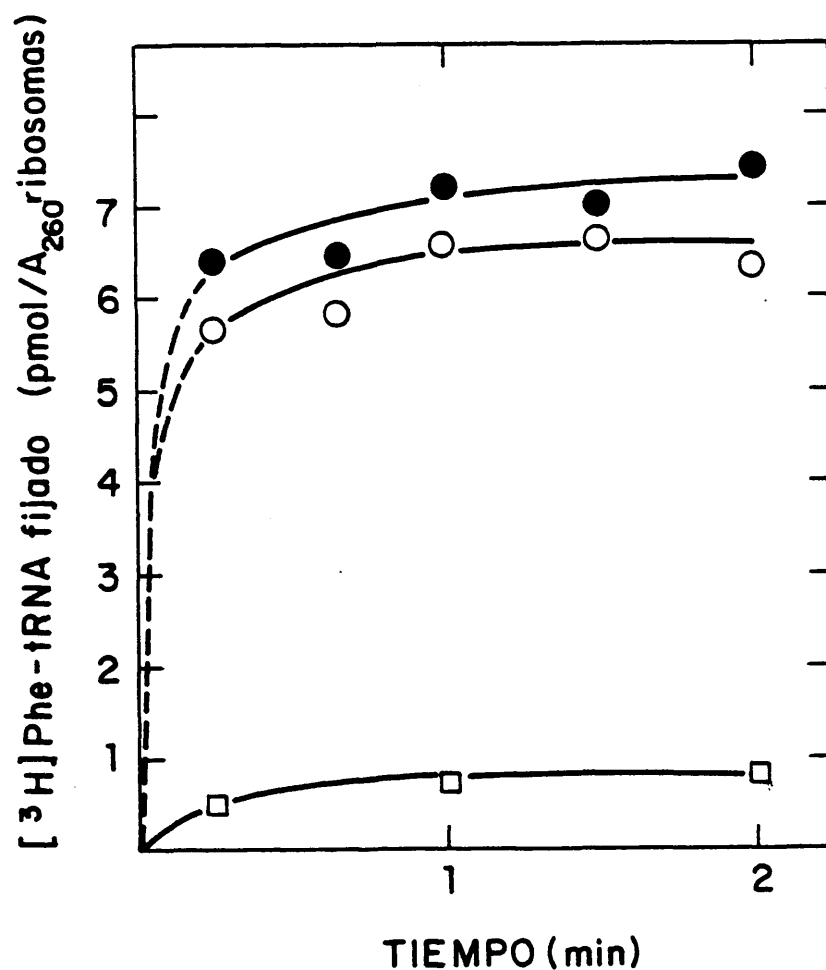


Figura 4.4.- Efecto de la higromicina B en la cinética de fijación de $[^3\text{H}]$ Phe-tRNA a ribosomas, dependiente de EF-T y GTP. El experimento se realizó como en el apartado III.1.2, en mezclas de reacción de $80\ \mu\text{l}$ con (●) y sin (○) higromicina B. Las mezclas se preincubaron a 30°C durante 1 min antes de la adición del factor; a los tiempos señalados se determinó en alícuotas de $15\ \mu\text{l}$ de las mezclas, la cantidad de $[^3\text{H}]$ Phe-tRNA fijado a los ribosomas. (□) representa la fijación en ausencia de EF-T y GTP.

La Figura 4.4 muestra la cinética de fijación de $[^3\text{H}]$ Phe-tRNA en ausencia (o) y en presencia de la higromicina B a la concentración de $80\text{ }\mu\text{M}$ (●). La fijación que transcurre rápidamente en ambos casos (en menos de 15 s la reacción es completa), se estimula ligeramente por el antibiótico.

IV.1.4. Ausencia de efecto de la higromicina B sobre la peptidil-transferasa

El antibiótico puromicina constituye un buen sustrato aceptor para la enzima peptidil-transferasa y forma enlace peptídico con el peptidil-tRNA, o análogos del mismo, situado en el sitio P (Traut y Monro, 1964; Haenni y Lucas-Lenard, 1968).

Investigamos el efecto de la higromicina B en la formación del enlace peptídico entre la puromicina y el Ac $[^{14}\text{C}]$ Phe-tRNA previamente translocado al sitio P, en ausencia del antibiótico. La Figura 4.5 muestra la cinética de formación del AcPhe-puromicina; la higromicina B no afecta significativamente la reacción.

IV.1.5. Inhibición por la higromicina B de la translocación enzimática

IV.1.5.1. Translocación enzimática de AcPhe-tRNA

Estudiamos a continuación el efecto de la higromicina B en

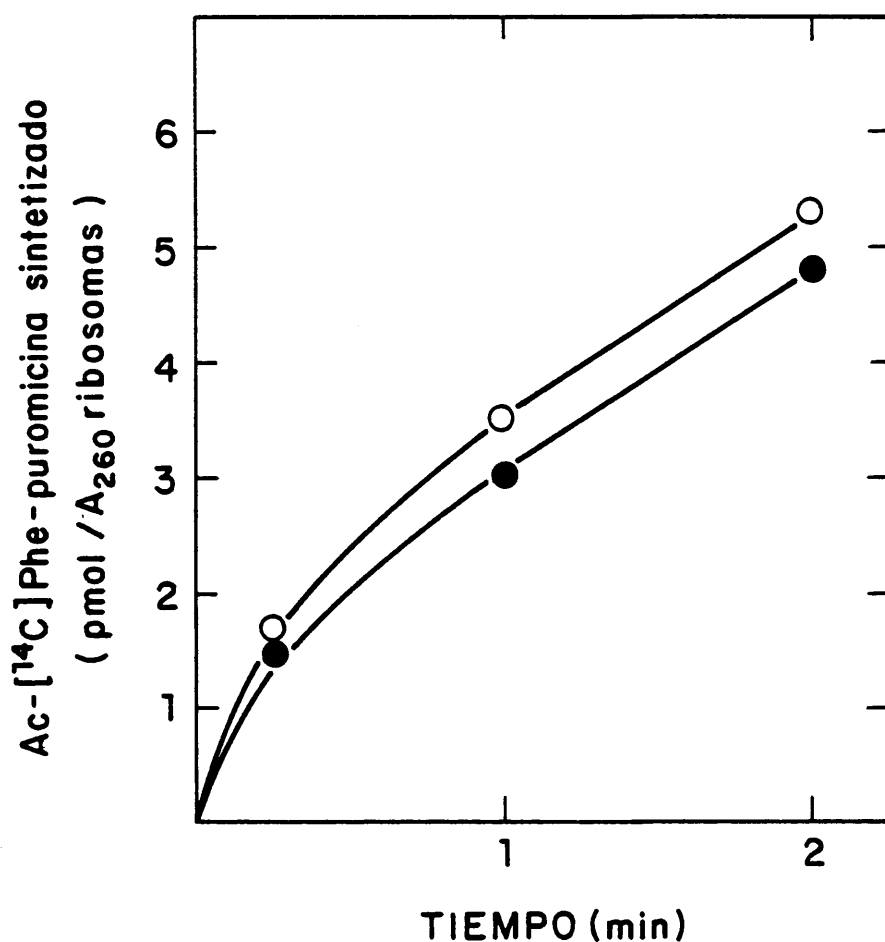


Figura 4.5.- Efecto de la higromicina B en la actividad peptidil-trans-ferasa del ribosoma. En este experimento, ribosomas con Ac [¹⁴C] Phe-tRNA fijado en el sitio A, se preincubaron a 30°C durante 5 min con 120 µg/ml de EF-G y GTP (apartado III.6.). A dos porciones de 40 µl de la mezcla se les añadió 5 µl de higromicina B 0,8 mM (●) o 5 µl de H₂O (○) y 1 min después 5 µl de puromicina 5 mM. La incubación prosiguió a 30°C y a los tiempos indicados se analizó en alícuotas de 15 µl, el AcPhe-puromicina sintetizado. La radiactividad extraíble en acetato de etilo en un control sin puromicina, se sustrajo de todos los valores.

la translocación del Ac [^{14}C]Phe-tRNA del sitio ribosómico A al P, dependiente del factor de polimerización G y de GTP. La translocación de este análogo del peptidil-tRNA puede medirse fácilmente ya que dicho compuesto es un excelente sustrato donador para la peptidil-transferasa y reacciona rápidamente con la puromicina, solo cuando se encuentra en el sitio P (ver apartado III.2.1). El producto de la reacción Ac [^{14}C]Phe-puromicina se desprende del ribosoma y se extrae con acetato de etilo, pudiendo entonces ser cuantificado.

En la Figura 4.6, se observa que tanto la velocidad como la extensión de la formación de Ac [^{14}C]Phe-puromicina se inhiben fuertemente en presencia de 80 μM de higromicina B (\bullet). Esta inhibición es máxima a los 2 min de incubación en que la translocación practicamente se ha completado en el control sin antibiótico (\circ).

El efecto de la concentración de higromicina B en la inhibición de translocación enzimática del AcPhe-tRNA se muestra en la Figura 4.1 (\blacksquare). En ella se observa que el proceso de translocación del AcPhe-tRNA es menos sensible al antibiótico que la polimerización polipeptídica estudiada en un sistema de Ac [^{14}C]Phe-([^3H]Phe) $_n$ (\square), puesto que aproximadamente se precisa el doble de higromicina B (4 μM), para conseguir un 50% de inhibición de la translocación; la máxima inhibición (del orden del 80%) requiere concentraciones del antibiótico superiores a 100 μM .

IV.1.5.2. Translocación enzimática del peptidil-tRNA en polisomas

La inhibición de translocación por la higromicina B, obser-

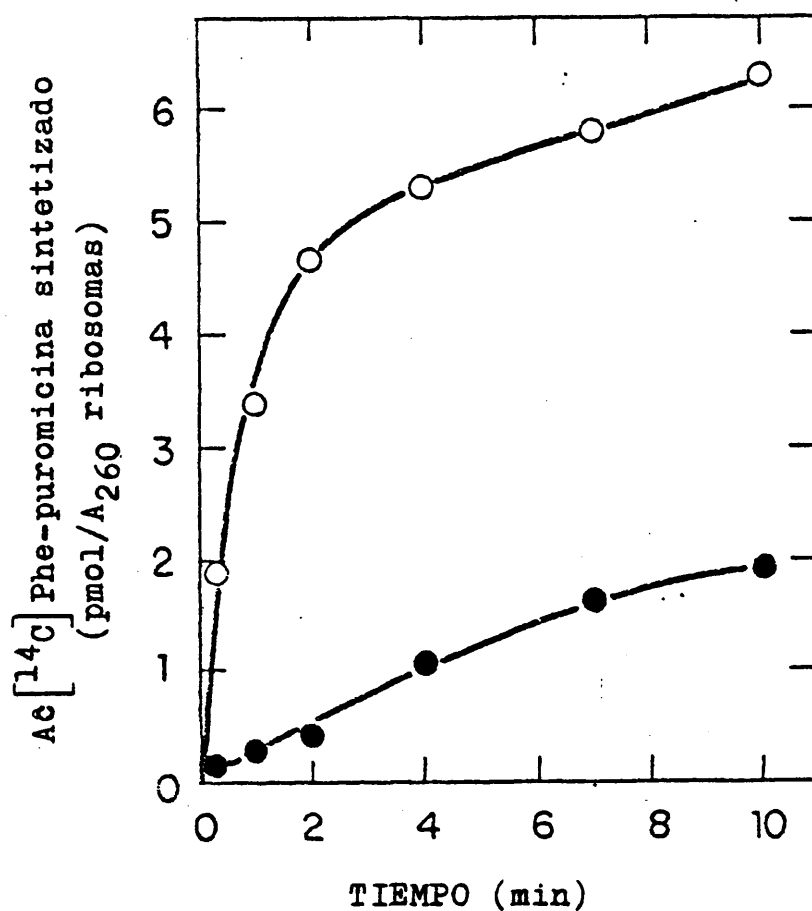


Figura 4.6.- Efecto de la higromicina B en la cinética de translocación del Ac [¹⁴C] Phe-tRNA. Las características de este ensayo se detallan en III.2.2. La reacción, en mezclas de 100 μ l previamente incubadas 1 min a 30°C, comenzó con la adición del factor G. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 15 μ l en las que se determinó el Ac [¹⁴C] Phe-puromicina sintetizado en presencia (●) de higromicina B 80 μ M o en su ausencia (○).

vada en el sistema modelo, fué posteriormente verificada en un sistema más fisiológico: los polisomas endógenos de E. coli purificados. La mayor parte de los ribosomas que constituyen estos polisomas llevan el peptidil-tRNA unido al sitio ribosómico A. Esta situación se debe al procedimiento seguido para la obtención de los polisomas, el cual conlleva un enfriamiento rápido de las células en crecimiento con el fin de detener la síntesis de proteínas (apartado II.3). El proceso de translocación es más afectado por las bajas temperaturas (Lucas-Lenard y Haenni, 1969) que la fijación del aminoacil-tRNA (Gordon, 1969) o la formación del enlace peptídico (Pestka, 1972a), por lo que el peptidil-tRNA se acumula en la situación de pretranslocación.

La posición del peptidil-tRNA polisómico se determinó por su reacción con [^3H] puromicina. Como se observa en la Figura 4.7, la adición de EF-G y GTP al sistema de polisomas (que promueve la translocación del peptidil-tRNA al sitio P) estimula entre 2 y 3 veces la reacción de las cadenas peptídicas con la puromicina. Esta estimulación es fuertemente inhibida por la higromicina B a la concentración de 80 μM . La inhibición es máxima a tiempos cortos de incubación, observándose a tiempos más largos un apreciable escape de las cadenas al sitio P, posiblemente debido a que el bloqueo de la translocación por el antibiótico no es del todo completo.

Cuando estudiamos el efecto de concentraciones crecientes de la higromicina B en la translocación del peptidil-tRNA en polisomas, la curva de inhibición obtenida, Figura 4.1 (●), fué sensiblemente parecida a la de la translocación del AcPhe-tRNA (■); sin embargo, la translocación en el sistema dirigido por RNA mensajero natural, era ligeramente menos sensible a bajas concentraciones del antibióti-

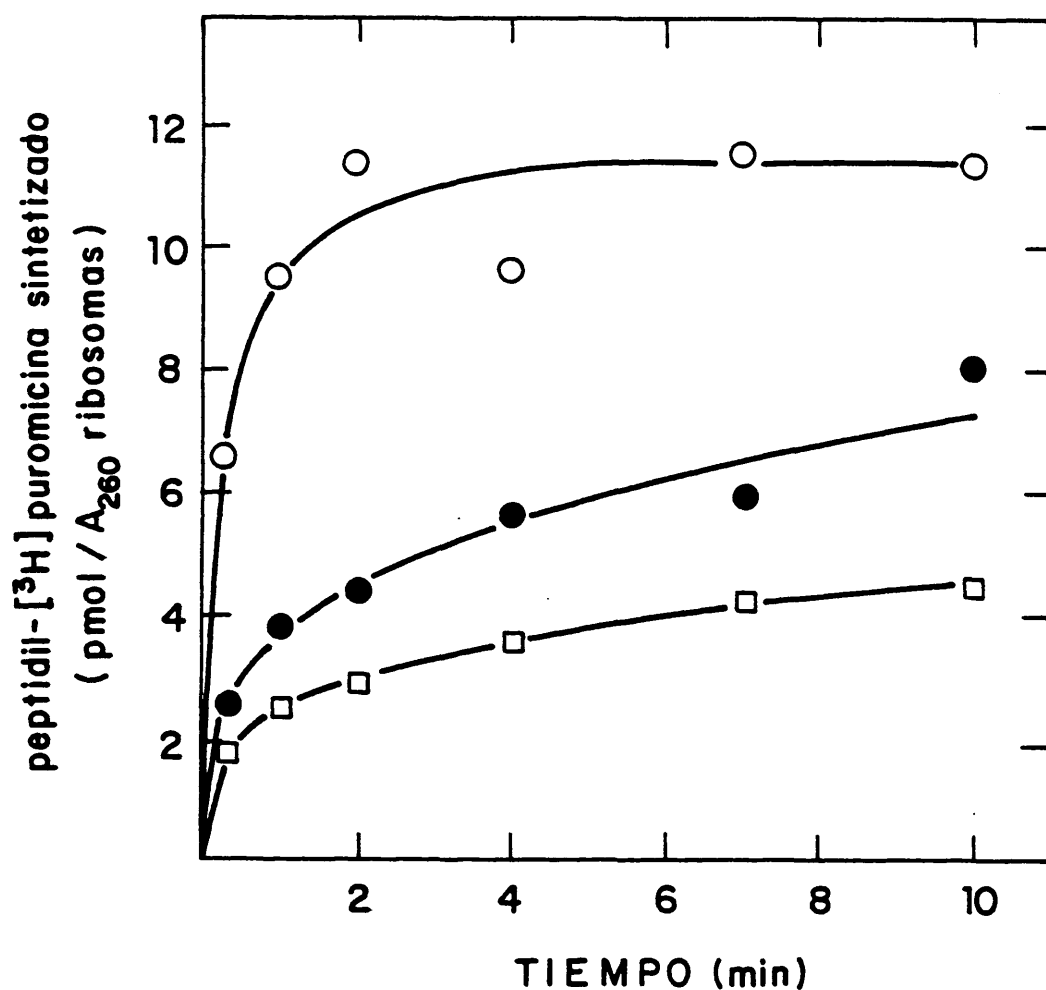


Figura 4.7.- Efecto de la higromicina B $80 \mu\text{M}$ en la translocación del peptidil-tRNA en polisomas, dependiente de EF-G y GTP. La síntesis de peptidil- [^3H] puromicina dependiente del factor G y de GTP se realizó en mezclas de $100 \mu\text{l}$ (apartado III.2.3) con (●) y sin (○) higromicina B. El producto de la reacción se determinó a los tiempos que indica la Figura en alícuotas de $15 \mu\text{l}$ de las mezclas. (□) representan los valores obtenidos en una mezcla de reacción paralela sin EF-G y GTP.

co, Por otra parte, si comparamos la inhibición de translocación con la obtenida al ensayar el efecto de la higromicina B en la polimerización de polipéptido en polisomas (o), podemos deducir, al igual que en los sistemas más purificados, que la síntesis es más sensible al antibiótico que la etapa de translocación estudiada como reacción aislada.

Esta diferencia de sensibilidad, observada en cualquiera de los dos sistemas, pudiera deberse a las diferentes condiciones en que se realizan ambos ensayos o bien a que la higromicina B, además de la translocación, afectara otras etapas del ciclo de polimerización. Estas posibles interferencias no se han detectado en las reacciones ensayadas por nosotros.

IV.1.5.3. Posición de las cadenas polipeptídicas nacientes en sistemas de síntesis bloqueados por la higromicina B

Los resultados obtenidos, en los experimentos descritos en apartados anteriores, indican que la higromicina B inhibe la translocación enzimática, estudiada como una etapa aislada del ciclo de polimerización. Por otra parte, la polimerización de la cadena peptídica en los distintos sistemas estudiados, es más sensible al antibiótico. Quedaba, pues, por elucidar la correlación existente entre estos dos efectos inhibidores, es decir, si el efecto de la higromicina B en el ciclo de polimerización era realmente debido a la inhibición por el antibiótico de la etapa de translocación. La prueba más contundente, para establecer o desechar esta correlación, consiste en añadir el

inhibidor a un sistema que está activamente sintetizando proteínas y determinar la posición del peptidil-tRNA. Si el inhibidor afecta la translocación, debe bloquear la síntesis confinando al peptidil-tRNA en el sitio A, posición en la que no reacciona con puromicina. Por el contrario, si el antibiótico actúa sobre la fijación del aminoacil-tRNA, retendrá la cadena peptídica en el sitio donador, haciendo posible la formación del peptidil-puromicina. De todos los antibióticos que actúan en sistemas procarióticos y que, normalmente, se han considerado inhibidores de translocación (ácido fusídico, tiostrepton, siomicina, micrococina etc.....), tan solo la viomicina cumple este requerimiento tan estricto (Modolell y Vazquez, 1977).

Experiencias previas en el laboratorio, habían demostrado que la inhibición de la reacción de la puromicina no es casi nunca completa, especialmente con compuestos que no bloquean totalmente la síntesis y permiten la salida parcial del peptidil-tRNA del sitio A del ribosoma (Modolell y Vazquez, 1977). Por tanto, para realizar el experimento utilizamos dos antibióticos como control: la viomicina y la tetraciclina, potentes inhibidores ambos del ciclo de polimerización. La viomicina inhibe fuertemente la translocación (Liou y Tanaka, 1976; Modolell y Vazquez, 1977) y la tetraciclina bloquea específicamente la fijación del aminoacil-tRNA (Vazquez, 1978) por lo que retienen al peptidil-tRNA en el sitio A y P, respectivamente.

La Figura 4.8 muestra los resultados del experimento realizado en un sistema crudo de síntesis de polifenilalanina con ribosomas dirigidos por poli(U) y extracto S100. En primer lugar, podemos observar que la adición de higromicina B, tetraciclina o viomicina al sistema que lleva 4,5 min sintetizando activamente, inhibió drásticamente

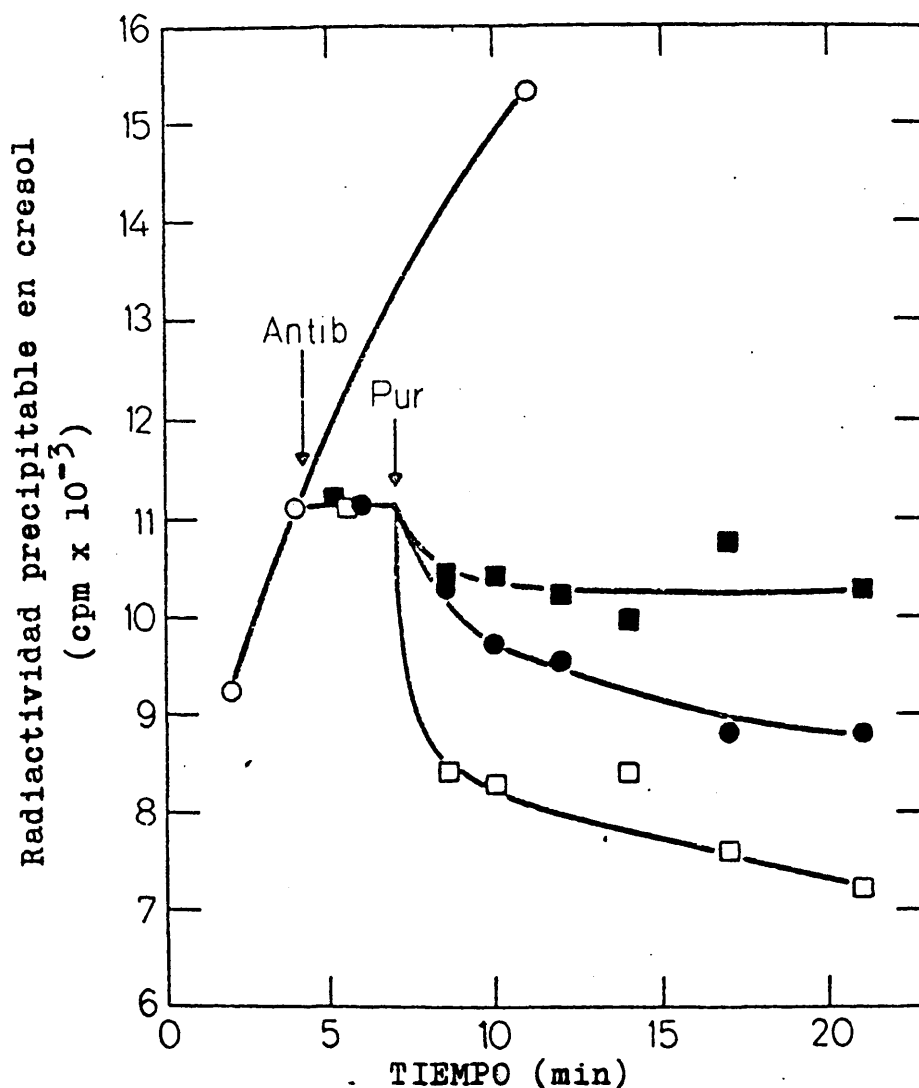


Figura 4.8.- Desprendimiento por la puromicina de las cadenas nacientes de polifenilalanina, en ribosomas bloqueados durante la síntesis por 65 μM de viomicina (■) 0,2 mM de higromicina B (●) o 0,2 mM de tetraciclina (□). El experimento se llevó a cabo como se describe en III.4.2. La síntesis de polifenilalanina se determinó midiendo en alícuotas de 20 μl la radiactividad precipitable en m-cresol (○). El alto fondo de radiactividad obtenido (más de 7000 cpm) fué debido al exceso de [³H] Phe-tRNA presente en la mezcla de reacción y no asociado a los ribosomas, que precipita en cresol.

la síntesis de polifenilalanina. Después de 1 min de incubación con los antibióticos, se añadió la puromicina y se analizó el [^3H]peptidil-puromicina formado por el método descrito en el apartado III.4.2. La interpretación de los resultados es la siguiente: en los ribosomas inhibidos por la tetraciclina, la puromicina libera rápidamente las cadenas de [^3H]polifenilalanina, lo cual se detecta por una disminución de la radiactividad en los filtros (el [^3H]peptidil-puromicina es soluble en m-cresol y no se retiene en los mismos). En contraste, en los ribosomas bloqueados por la viomicina no hay liberación de las cadenas, por lo que el nivel de radiactividad permanece prácticamente constante durante la incubación con la puromicina. En el caso de la higromicina B se observa que las cadenas peptídicas no se liberan rápidamente de los ribosomas, aunque si se aprecia una lenta disminución de la radiactividad a lo largo del tiempo de incubación. Este resultado se debe, probablemente, a que si bien la higromicina B, del mismo modo que la viomicina, retiene el peptidil-tRNA en el sitio aceptor, su acción inhibidora no es tan drástica, permitiendo un ligero escape de las cadenas peptídicas al sitio P y, en consecuencia, su liberación con la puromicina.

La Figura 4.9 muestra los resultados de un experimento similar llevado a cabo en un sistema de síntesis de polifenilalanina altamente purificado, constituido por ribosomas programados con poli(U) y suplementado con factores puros de polimerización. Como la longitud media de las cadenas peptídicas sintetizadas en este sistema es menor que la de las cadenas polimerizadas en el sistema (más crudo) del experimento anterior, se analizó el [^3H]peptidil-puromicina, formado después del bloqueo de la síntesis por los tres antibióticos especifica-

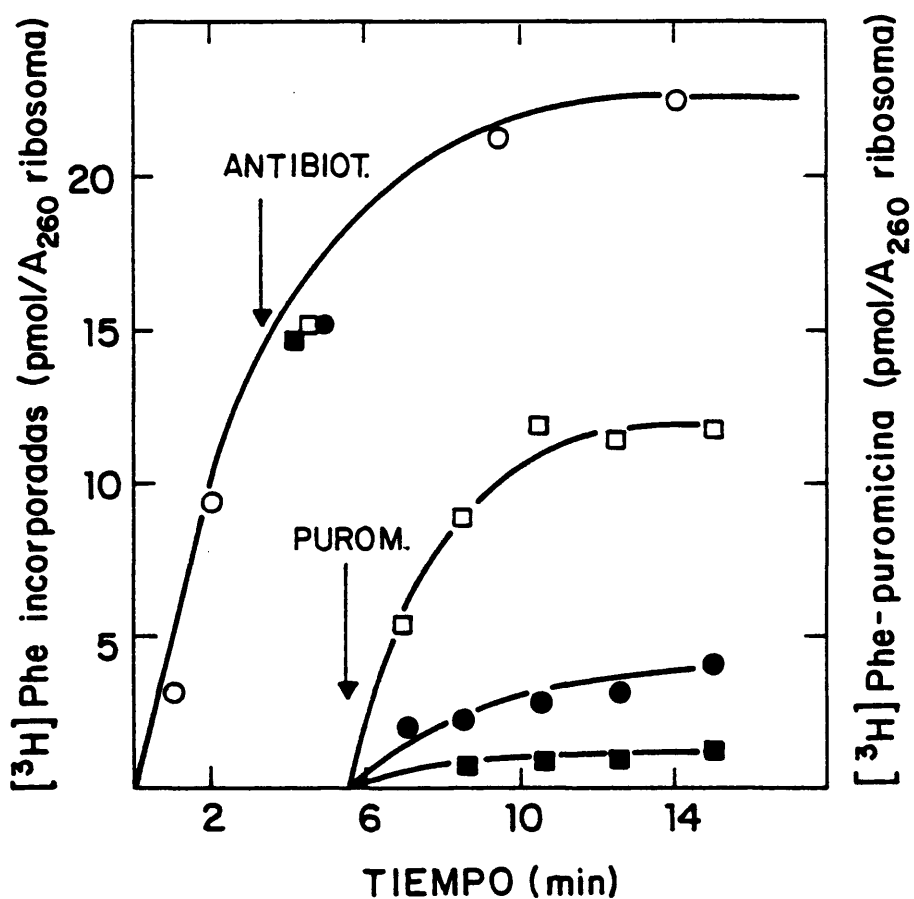


Figura 4.9.- Cinética de la formación de $\text{Ac} [^{14}\text{C}] \text{Phe} - ([^3\text{H}] \text{Phe})_{n>1}$ -puromicina en ribosomas bloqueados durante la síntesis peptídica (con factores purificados) por $50 \mu\text{M}$ de viomicina (■), $0,23 \text{ mM}$ de higromicina B (●) ó $0,2 \text{ mM}$ de tetraciclina (□). El experimento se llevó a cabo como se indica en III.4.2. La síntesis polipeptídica a 30°C se determinó en alícuotas de $15 \mu\text{l}$ por precipitación con TCA caliente.

dos, por extracción con acetato de etilo. La mayor reactividad con la puromicina se traduce, en este caso, en un aumento de la radiactividad en el solvente orgánico. La higromicina B, inhibe claramente la translocación de las cadenas nacientes al sitio donador. Su poder inhibidor, como en el caso anterior, es algo menos potente que el de la viomicina.

El mismo resultado se obtuvo al estudiar la posición de las cadenas nacientes en el bloqueo de un sistema de síntesis más fisiológico, constituido por polisomas endógenos de E. coli suplementados con extracto S100 y los veinte aminoácidos no marcados radiactivamente. En la Figura 4.10 se observa que las cadenas polisomales nacientes de un control de síntesis sin antibiótico o de polisomas bloqueados por la tetraciclina, reaccionan rápidamente (en menos de 1 min de incubación) con la [^3H] puromicina añadida a la mezcla de incubación después del bloqueo (o no) de la síntesis. Por el contrario, en polisomas inhibidos por la higromicina B, tan solo la mitad de las cadenas nacientes reaccionan con [^3H] puromicina rápidamente. Desconocemos cual es la razón de esta reacción inicial que, por otra parte, también se ha observado en polisomas bloqueados por la viomicina (Modolell y Vazquez, 1977).

Los datos obtenidos en estos experimentos, llevados a cabo en tres sistemas de síntesis polipeptídica en los que previamente habíamos observado la acción inhibidora de la higromicina B (Figuras 4.1 y 4.2), parecen indicar que dicho antibiótico es un buen inhibidor de la translocación enzimática. Su interferencia con esta etapa del ciclo de polimerización parece ser la responsable, al menos en parte, de su efecto inhibidor en la síntesis de proteínas.

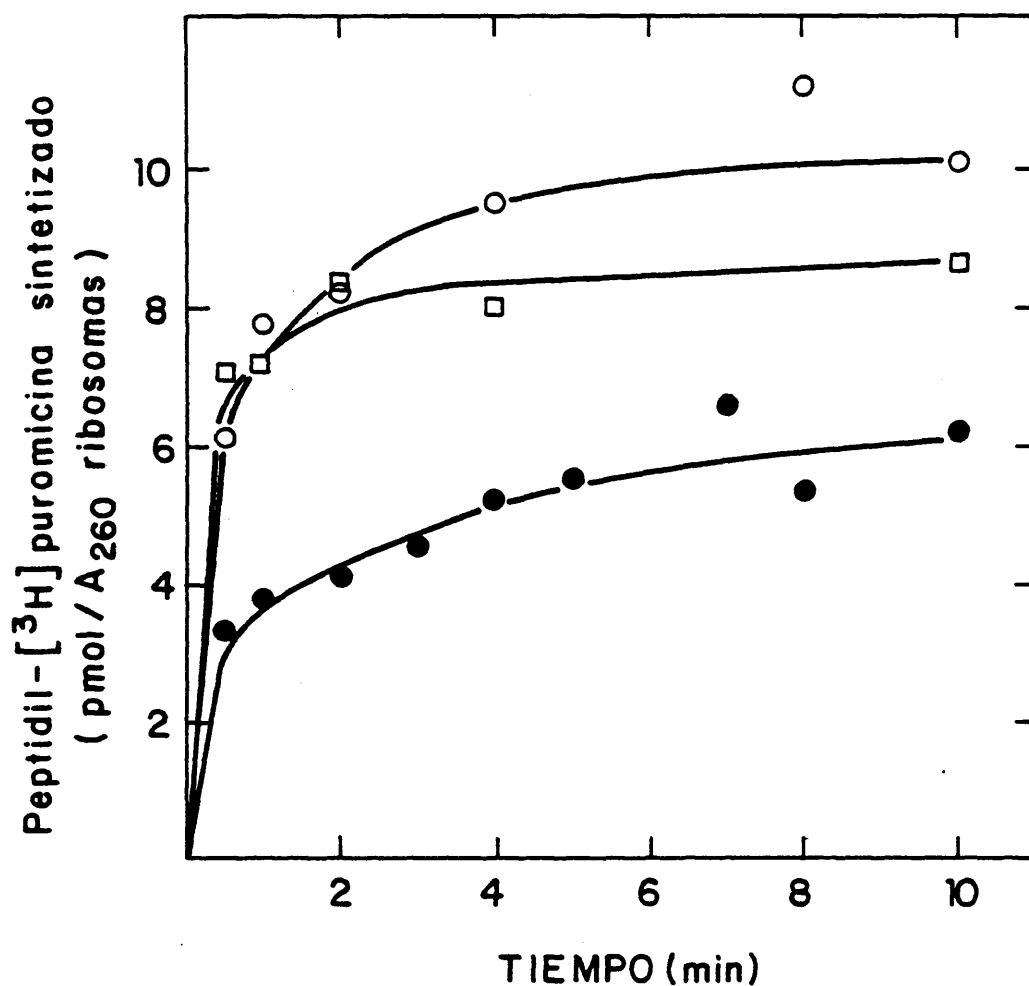


Figura 4.10.- Cinética de formación de peptidil-[³H]puromicina en polisomas endógenos que están sintetizando activamente (○) y en los bloqueados durante la síntesis peptídica por 0,13 mM de higromicina B (●) ó 0,18 mM de tetraciclina (□). El experimento se llevó a cabo como se indica en III.4.1, en mezclas de reacción de 100-160 μ l que se incubaron 6 min a 34°C, antes de la adición de los antibióticos.

IV.1.6. Mecanismo de la inhibición de la translocación ribosómica por la higromicina B

Para obtener una mayor información sobre el mecanismo por el cual la higromicina B inhibe el proceso de translocación, estudiamos el efecto del antibiótico en una serie de reacciones parciales que nos dan cuenta de las interacciones del factor G (responsable de la translocación) con el ribosoma; también ensayamos la acción del antibiótico en otras reacciones implicadas de alguna forma en el proceso de translocación.

IV.1.6.1. Efecto de la higromicina B en la síntesis no enzimática de polifenilalanina

Primeramente investigamos si el efecto inhibidor de la higromicina B sobre la translocación se debía a una interacción directa del antibiótico sobre el ribosoma o si, por el contrario, era debido a interferencias con la función del factor de polimerización G. Para ello, estudiamos el efecto de la higromicina B, a varias concentraciones, en la síntesis no enzimática de polifenilalanina.

En un sistema de síntesis de ribosomas dirigidos por poli(U) puede tener lugar, aunque muy lentamente, la síntesis de polifenilalanina en ausencia de factores de polimerización y GTP (Gavrilova y Spirin, 1971; Gavrilova y cols., 1974). Esta síntesis no enzimática se estimula por la adición de un reactivo de los grupos sulfhidrilo, el p-cloro-mercuribenzoato (Gavrilova y Spirin, 1971).

Los resultados obtenidos con la higromicina B en este sistema de síntesis se muestran en la Tabla 4.I. El antibiótico, a las tres concentraciones usadas, inhibe fuertemente (más del 90%) la síntesis no enzimática de polifenilalanina. Como en experimentos previos habíamos comprobado que la fijación no enzimática del aminoacil-tRNA no se afectaba por la higromicina B, el efecto observado en la síntesis no enzimática es, probablemente, debido a su acción en el proceso de translocación, e indica que dicho antibiótico no requiere la presencia del factor de polimerización G para su acción inhibidora.

IV.1.6.2. Ausencia de efecto de la concentración de EF-G en la inhibición de la translocación por el antibiótico

La no dependencia del factor G para la inhibición de la translocación por la higromicina B, se puso posteriormente de manifiesto cuando estudiamos el efecto de concentraciones crecientes del factor en la inhibición de la translocación de AcPhe-tRNA. Este ensayo se llevó a cabo con ribosomas a los que se había fijado, no enzimáticamente, N-Ac [^{14}C] Phe-tRNA en el sitio A y posteriormente se translocó al sitio P en presencia de EF-G y GTP e higromicina B, cuando se indique. La Figura 4.11 muestra que el aumento en la concentración de EF-G, hasta aproximadamente una concentración de $75 \mu\text{g/ml}$ del factor, estimula la translocación, pero no afecta significativamente la inhibición de la misma por el antibiótico, a las dos concentraciones usadas (8 y $80 \mu\text{M}$). En consecuencia, podemos concluir que la higromicina B, a diferencia de otros antibióticos clasicamente considerados inhibido-

Tabla 4.I.- Efecto de la higromicina B en la síntesis no enzimática de polifenilalanina.

| Mezcla de reacción | $^3\text{H}[\text{Phe}]$ incorporado (pmol/A ₂₆₀ ribosomas) | %Inhibición |
|---------------------------------|---|-------------|
| Control | 4,3 | 0 |
| +Higromicina B 16 μM | 0,25 | 94 |
| +Higromicina B 80 μM | 0,32 | 93 |
| +Higromicina B 0,4 mM | 0,22 | 95 |

La síntesis no enzimática de polifenilalanina se llevó a cabo como se describe en el apartado III.3.2., en ausencia y en presencia del antibiótico a las concentraciones indicadas. Los controles obtenidos en mezclas paralelas sin poli(U), 0,38 pmol de $[\text{}^3\text{H}]\text{Phe}/\text{A}_{260}$ de ribosomas, se restaron de los valores obtenidos.

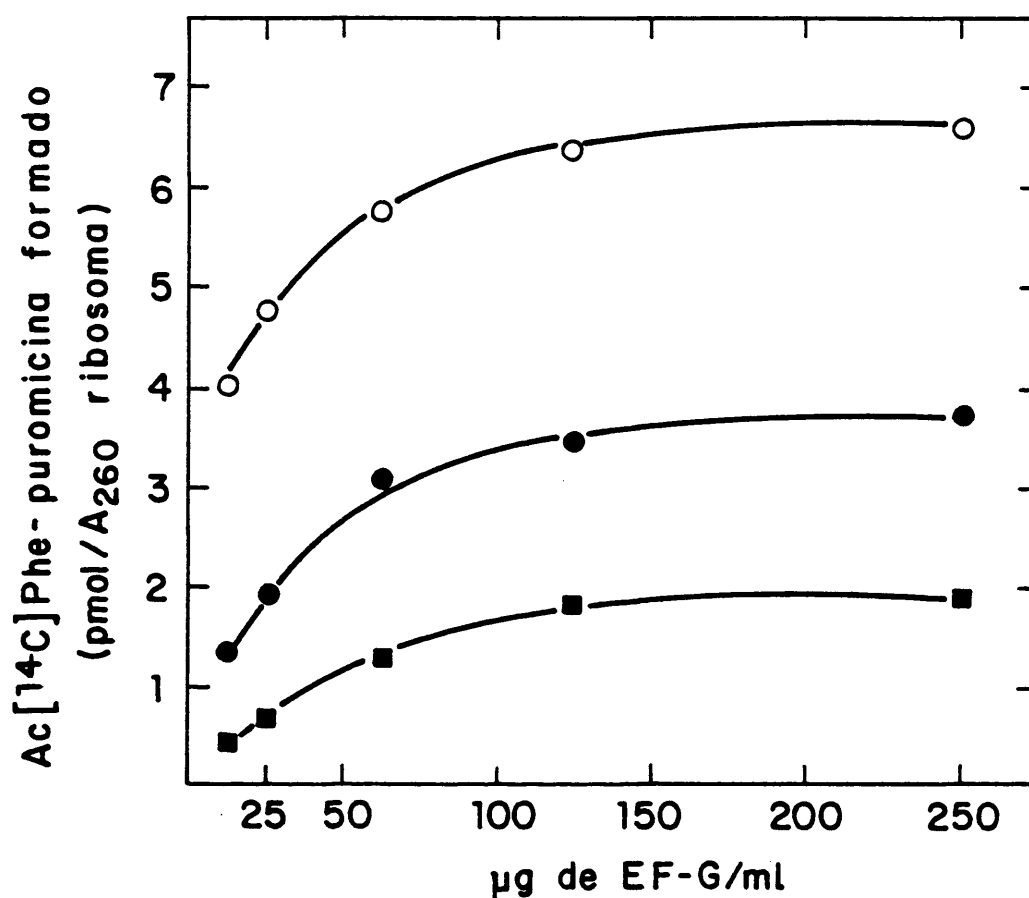


Figura 4.11.- Efecto de la concentración de EF-G en la inhibición de la translocación por la higromicina B. La translocación del Ac [¹⁴C] Phe-tRNA dependiente de EF-G y de GTP, se realizó como se indica en el apartado III.2.2 en mezclas de reacción de 20 µl, que se incubaron 4 min a 30°C en ausencia (○) o en presencia de la higromicina B a la concentración de 8 M (●) y 80 M (■). En este experimento se incubó previamente el GTP en un sistema regenerante de energía. Un control sin EF-G sintetizó 1,8 pmol de Ac [¹⁴C] Phe-puromicina/A₂₆₀ de ribosomas, valor que se sustrajo de los resultados obtenidos.

res de translocación (ácido fusídico y derivados), no inhibe la translocación enzimática por atrapamiento del EF-G sobre ribosomas, ya que un exceso del factor (hasta 0,24 mg/ml) no revierte la acción inhibidora del antibiótico.

IV.1.6.3. Carencia de efecto de la higromicina B en la interacción del EF-G con el ribosoma

Decidimos corroborar la no implicación del EF-G en la inhibición de la translocación por higromicina B, examinando su posible efecto en interacciones entre EF-G, guanosin nucleotido y ribosoma. Como ya apuntamos en el capítulo de Introducción (apartado I.1.3.3) el factor G interacciona con el ribosoma en ausencia de RNA mensajero y del aminoacil-tRNA, estimulando la hidrólisis catalítica de GTP. Esta actividad GTPásica se ha denominado GTPasa desacoplada por no estar ligada al proceso de translocación. Por otra parte, en presencia del ácido fusídico la interacción entre EF-G, GTP y ribosoma conduce, tras la hidrólisis de GTP, a GDP más Pi, a la formación de un complejo estable GDP·EF-G·ribosoma·ác. fusídico fácilmente detectable.

Comprobamos el efecto de la higromicina B en estos dos sistemas modelos, y los resultados se muestran en la Tabla 4.II. La higromicina B, a la concentración de 80 μ M (a la cual el 80% de la translocación está inhibida como se observa en la Figura 4.1) carece de efecto, tanto en la GTPasa desacoplada dependiente de EF-G y ribosomas, como en la formación del complejo cuaternario estable [3 H]GDP·EF-G·ribosoma·ác. fusídico.

Tabla 4.II.- Ausencia de efecto de la higromicina B en la formación de $[^3\text{H}] \text{GDP} \cdot \text{EF-G} \cdot \text{ribosoma} \cdot \text{ácido fusídico}$ y en la hidrólisis de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{GTP}$ dependiente de EF-G y ribosomas.

| Mezcla de reacción | $[^3\text{H}] \text{GDP}$ fijado | $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{GTP}$ hidrolizado |
|---------------------------------|----------------------------------|--|
| | moléculas/ribosomas | |
| Control | 0,53 | 181 |
| +Higromicina B 80 μM | 0,52 | 176 |

Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en Métodos (apartados III.8 y III.7, respectivamente). En la formación del complejo cuaternario se restó a los resultados el valor obtenido en una mezcla paralela sin EF-G (0,13 moléculas de $[^3\text{H}] \text{GDP}$ /ribosoma).

Un resultado similar se obtuvo al estudiar el intercambio de nucleótidos de guanosina, concretamente el de GDP, en el complejo $[^3\text{H}]\text{GDP}\cdot\text{EF-G}\cdot\text{ribosoma}\cdot\text{ác fusídico}$. Si utilizamos el nucleótido isotópicamente marcado para formar el complejo cuaternario, podemos estimar la reversibilidad del mismo añadiendo al complejo, una vez formado, un exceso de nucleótido libre no radiactivo. El intercambio ocurre vía un complejo binario GDP·EF-G (Baca y cols., 1976; Girbés y cols., 1977) el cual, a diferencia del complejo cuaternario, no se retiene en los filtros de nitrocelulosa, por tanto el desprendimiento del nucleótido marcado del complejo se detecta por una disminución de la radiactividad asociada a los ribosomas. En la Figura 4.12 se observa que la higromicina B a la concentración de $80\text{ }\mu\text{M}$ no afecta sensiblemente el intercambio de $[^3\text{H}]\text{GDP}$ en el complejo cuaternario, es decir, no tiene efecto sobre la estabilidad del mismo.

De los resultados hasta aquí obtenidos, se dedujo que la higromicina B impedía la translocación sin interferir con el factor G o su función. Quedaba pues por elucidar el modo de acción del antibiótico. Dado que el proceso de translocación conlleva el movimiento del peptidil-tRNA de un sitio ribosómico a otro, pensamos que quizás el antibiótico pudiera interferir con este movimiento, bien bloqueando la salida del peptidil-tRNA del sitio A o su entrada en el P.

IV.1.6.4. Acción de la higromicina B en el movimiento del peptidil-tRNA

Para comprobar si el antibiótico impedía la entrada de la

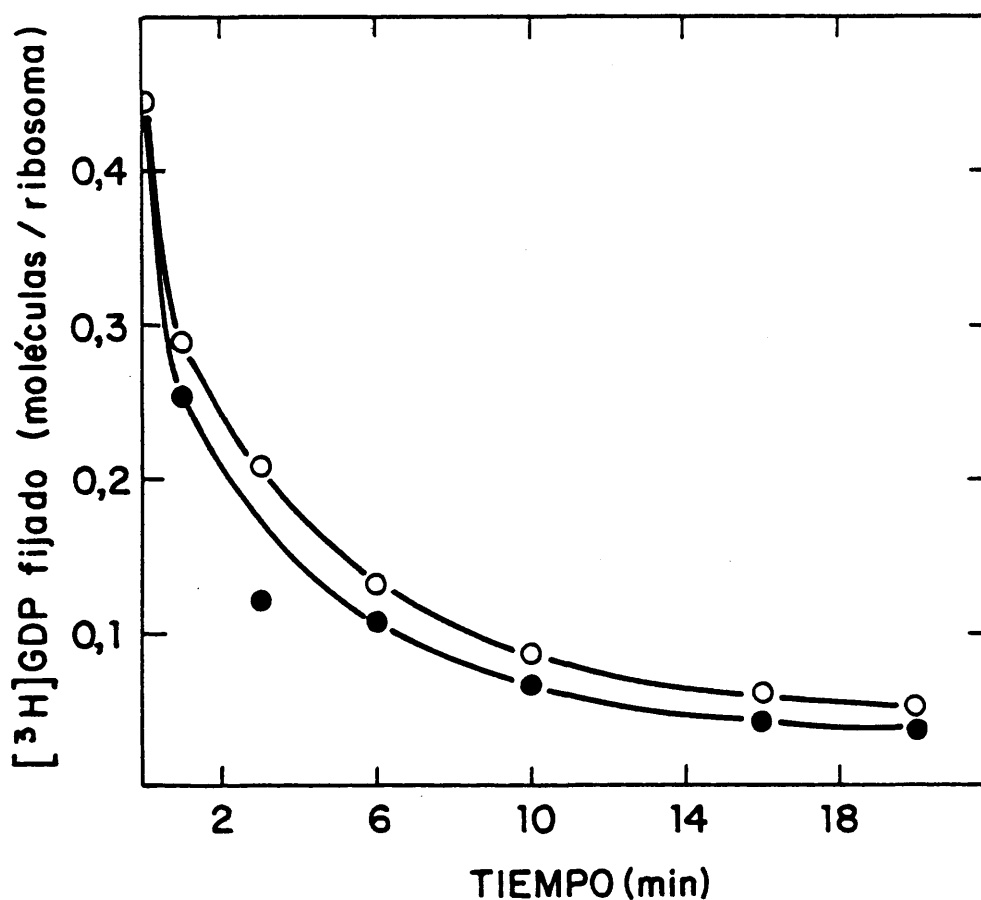


Figura 4.12.- Efecto de la higromicina B en el intercambio de [³H]GDP en el complejo [³H]GDP.EF-G.ribosoma.ác. fusídico. El experimento se realizó como se describe en III.9, en ausencia (○) o en presencia de 80 μM de higromicina B (●). El valor obtenido en una mezcla de reacción paralela sin EF-G (0,03 moléculas de [³H]GDP/ribosoma) se restó de los resultados.

cadena peptídica en el sitio P, examinamos si en su presencia el sitio donador del ribosoma es capaz de fijar N-Ac[^{14}C]Phe-tRNA^{Phe}, un análogo del peptidil-tRNA cuya translocación es eficientemente inhibida por la higromicina B (Figura 4.6). A alta concentración de Mg^{++} (entre 15 y 20 mM) éste ligando se fija no enzimáticamente en el sitio A, pero a la concentración de 6 mM se sitúa, preferentemente, en el P (Watanabe, 1972), lo cual es fácilmente comprobable por la reacción con la puromicina.

La Tabla 4.III muestra que la higromicina B no modifica la fijación de N-Ac[^{14}C]Phe-tRNA a los ribosomas, medida por filtración a través de filtros de nitrocelulosa, y que dicha fijación, al igual que en el control sin antibiótico, ocurre en el sitio P puesto que todo el compuesto fijado reacciona con la puromicina.

La otra posibilidad, anteriormente mencionada, la interferencia de la higromicina B con la salida del peptidil-tRNA del sitio aceptor, la analizamos ensayando el efecto del antibiótico en el desprendimiento del N-Ac[^{14}C]Phe-tRNA^{Phe} del sitio A, inducido al disminuir drásticamente la concentración de iones NH_4^+ de la mezcla de reacción. Los trabajos de Watanabe (1972) demostraban que la incubación del complejo AcPhe-tRNA·ribosoma·poli(U) a bajas concentraciones de NH_4^+ , daba lugar a la salida del AcPhe-tRNA del sitio ribosómico A. En la Tabla 4.IV se muestra el resultado de este experimento. En el control sin antibiótico observamos que al bajar la concentración del ión NH_4^+ de 40 mM a 5 mM, mediante dilución de la muestra en un tampón que carece de dicho ión, más del 60% del AcPhe-tRNA fijado se desprende del ribosoma. La presencia de la higromicina B a la concentración de 70 μM inhibe de manera apreciable este desprendimiento. Este resulta-

Tabla 4.III.- Ausencia de efecto de la higromicina B en fijación no enzimática de Ac [^{14}C] Phe-tRNA al sitio ribosómico P.

| Mezcla de reacción | Ac [^{14}C] Phe-tRNA | |
|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| | fijado | reactivo con puromicina |
| | pmol/A ₂₆₀ ribosomas | |
| Control | 3,15 | 3,5 |
| +Higromicina B 80 μM | 3,33 | 3,9 |

La reacción se llevó a cabo en mezclas de 20 μl , que contenían: NH_4Cl 17 mM, KCl 51 mM, Tris-HCl (pH 7,8) 13 mM, MgAc_2 6 mM, DTT 1 mM, 20,5 unidades ópticas de ribosomas complejados con poli(U), Ac [^{14}C] Phe-tRNA 0,15 μM e higromicina B cuando se indique. Después de incubar 15 min a 30°C, se analizó el Ac [^{14}C] Phe-tRNA fijado a los ribosomas en la mitad de las mezclas de reacción (apartado III.1.1.); las otras mezclas se suplementaron con 1 μl de puromicina 5 mM y se prosiguió la incubación durante 10 min, determinándose el Ac [^{14}C] Phe-puromicina sintetizado por extracción con acetato de etilo (apartado III.2.2.).

Tabla 4.IV.- Efecto de la higromicina B en el desprendimiento del Ac [^{14}C] Phe-tRNA de los ribosomas, inducido al disminuir la concentración de iones NH_4^+ .

| Incubación a 5 mM de NH_4^+ | Higromicina B | Ac [^{14}C] Phe-tRNA fijado | Desprendimiento % |
|---|---------------|---|----------------------|
| min | μM | | |
| 0 | 0 | 8,0 | — |
| 10 | 0 | 3,1 | 61,3 |
| 10 | 70 | 6,2 | 22,5 |

El experimento se realizó como se especifica en el apartado III.10. Las mezclas de reacción de 5 μl , se diluyeron hasta 40 μl con una solución tampón carente del ión NH_4^+ que, cuando se indica, contenía la higromicina B.

do, aunque difícil de interpretar puesto que se desconoce el mecanismo de salida del AcPhe-tRNA en las condiciones indicadas, sugiere que la higromicina B interfiere con el movimiento del peptidil-tRNA del sitio ribosómico A al P, impidiendo su salida del sitio A. Dicha interferencia podría ser debida a un impedimento estérico por el antibiótico o bien a que la fijación de este último al ribosoma, induzca un cambio conformacional o distorsión en el mismo, que dificulte el libre movimiento de la cadena peptídica.

IV.1.7. Discusión

Hemos observado que el antibiótico aminoglicosídico higromicina B inhibe eficientemente el ciclo de polimerización de la síntesis proteica, estudiado en distintos sistemas de síntesis in vitro dirigidos por RNA mensajeros sintéticos o naturales (Figuras 4.1 y 4.2). Al investigar el efecto de este antibiótico en las reacciones parciales del ciclo, hemos encontrado que la higromicina B inhibe la translocación dependiente del factor G y GTP, del AcPhe-tRNA o del peptidil-tRNA (Figuras 4.1, 4.7 y 4.6), careciendo de efecto inhibitor en otras etapas de la polimerización como la fijación del aminoacil-tRNA y la formación del enlace peptídico (Figuras 4.4 y 4.5). Por otra parte, cuando se añade la higromicina B a sistemas in vitro que están sintetizando polipéptidos activamente, bloquea inmediatamente la síntesis y retiene al peptidil-tRNA en una posición no reactiva con puromicina, es decir, en el sitio aceptor, lo cual indica que el antibiótico es un inhibidor de la translocación y que su interferencia con este pro-

ceso juega un papel fundamental en su mecanismo de inhibición de la síntesis polipeptídica.

El modo de acción de la higromicina B en la inhibición de la translocación presenta grandes semejanzas con el del antibiótico viomicina, otro inhibidor de la translocación con estructura química muy diferente (Liou y Tanaka, 1976; Modolell y Vazquez, 1977). Ambos antibióticos actúan en el ribosoma, puesto que inhiben fuertemente la síntesis no enzimática de polifenilalanina e impiden la salida del AcPhe-tRNA del sitio ribosómico A, inducida al bajar la concentración de iones NH_4^+ . A concentraciones efectivas en la inhibición de la translocación, no interfieren con las interacciones entre el EF-G, el nucleótido de guanosina y el ribosoma ya que ninguno de los dos antibióticos afecta la hidrólisis de GTP dependiente de G y de ribosomas (desacoplada de translocación), ni la formación del complejo estable $\text{GDP} \cdot \text{EF-G} \cdot \text{ribosoma} \cdot \text{ác. fusídico}$. Estos resultados parecen indicar que ambos compuestos inhiben la translocación porque interfieren con el movimiento del peptidil-tRNA del sitio A al P, impidiendo su salida del sitio aceptor. Sin embargo, la viomicina es un inhibidor más potente que la higromicina B, tal como se observa en las Figuras 4.8 y 4.9. Nos parece sorprendente encontrar tales semejanzas en el mecanismo de inhibición de la translocación entre dos antibióticos químicamente tan diferentes, puesto que la higromicina B es un aminoglicosídico (su estructura química se muestra en la Figura 1.5) y la viomicina es un péptido fuertemente básico (Glasby, 1976). El comportamiento de estos dos antibióticos en la inhibición de la translocación difiere bastante del de otros dos grupos de antibióticos (el grupo del ácido fusídico y el del tiostrepton, siomicina y tiopeptina) que se han descrito

como inhibidores de la translocación en algunos sistemas in vitro (Vazquez, 1978). Los antibióticos del tipo fusidato solo inhiben la translocación en sistemas en que EF-G está presente en cantidades catalíticas, y su acción se debe al atrapamiento del factor en la forma de complejos: GDP·EF-G·ribosoma·ác.fusídico. En sistemas con un exceso de EF-G o in vivo, su efecto inhibidor en la síntesis de proteínas se debe a la interferencia con el desprendimiento del factor G del ribosoma después de ocurrida la translocación y, consecuentemente, a la inhibición de la fijación del aminoacil-tRNA. Por su parte, el tiotrep-ton, la siomicina y la tiopeptina inhiben tanto la interacción del factor G con el ribosoma, como la fijación del aminoacil-tRNA.

Otra cuestión de interés supone el descubrimiento de que la inhibición por la higromicina B de la translocación ribosómica y la síntesis polipeptídica, ocurre simultáneamente con la inducción de errores en la lectura del mensajero (medida por la incorporación de [¹⁴C]serina). Efectivamente, si comparamos las Figuras 4.2 y 4.8, observamos que en el mismo sistema, 0,24 mM de higromicina B inhibe la incorporación de [³H]fenilalanina, por impedir la translocación de la cadena peptídica, y estimula la de [¹⁴C]serina. Estos dos efectos aparentemente antagónicos pueden coexistir puesto que en este sistema, incluso a altas concentraciones del antibiótico, la inhibición de la síntesis total no sobrepasa el 80% pudiendo tener lugar la incorporación de la serina en la síntesis residual.

Queda por aclarar si las interferencias con la fidelidad de la traducción y con la etapa de translocación son el resultado de la misma interacción (es) de la higromicina B con el ribosoma o si, por el contrario, se deben a interacciones independientes en diferen-

tes sitios de esta partícula. Con los datos experimentales de que disponemos nos es difícil encontrar la respuesta. Parece, no obstante, que la inhibición de la translocación y de la síntesis de polifenilalanina y la estimulación de la incorporación de serina, dependen paralelamente de la concentración del antibiótico (Figuras 4.1 y 4.2), lo cual es consistente con la primera hipótesis. Si esto fuera así, la doble acción de la higromicina B sobre el ribosoma sugeriría una estrecha relación entre los componentes ribosómicos implicados en el reconocimiento del aminoacil-tRNA y los implicados en la translocación ribosómica. Esta relación ha sido previamente sugerida por varios descubrimientos. Así, en la superficie ribosómica, los sitios de fijación del aminoacil-tRNA y del factor G, probablemente, se interponen (Modell y Vazquez, 1975) y el factor G, en ausencia de antibióticos, aumenta los errores intrínsecos de traducción en un sistema de síntesis dirigido por poli(U) (Gavrilova y cols., 1976). Otro hecho interesante, en apoyo de la posible relación mencionada, es nuestro descubrimiento de que otros antibióticos aminoglicosídicos, que inducen errores en la lectura del mensaje genético, inhiben eficientemente (como veremos en los próximos apartados de este mismo capítulo) la translocación ribosómica. Y además, la viomicina, potente inhibidor de translocación, también afecta la fidelidad de la traducción (apartado IV.3.6.1.). Parece, por tanto, muy posible que la fijación de la higromicina B al ribosoma distorsione algunos componentes del mismo implicados en el reconocimiento del aminoacil-tRNA y en la translocación ribosómica, interfiriendo con la selectividad del primero de estos procesos e inhibiendo el segundo.

IV.2. Efecto de los antibióticos aminoglicosídicos en el ciclo de polimerización de las cadenas peptídicas

IV.2.1. Introducción

Se sabe, desde hace varios años, que los antibióticos aminoglicosídicos de los grupos de la neomicina, kanamicina y gentamicina, actúan en el ribosoma y causan dos efectos en su función: la inhibición de la síntesis de proteínas y la inducción de errores en la traducción del mensaje genético (Davies y cols., 1965; Davies y Davis, 1968); tradicionalmente se ha considerado a este segundo efecto, debido a la interferencia con la fijación de aminoacil-tRNA, responsable, al menos en parte, del primero.

Los interesantes resultados obtenidos con la higromicina B, un antibiótico aminoglicosídico perteneciente a otro grupo, que interfiere con la translocación ribosómica y con la fidelidad de la traducción, nos han llevado a investigar si otros compuestos del grupo de los aminoglicosídicos presentan una acción similar sobre la síntesis de proteínas.

IV.2.2. Efecto de varios antibióticos aminoglicosídicos en la fijación enzimática del Phe-tRNA

Como ya hicimos con la higromicina B, estudiamos el efecto de algunos de estos antibióticos en las etapas individuales del ciclo

de polimerización de la síntesis protéica.

Examinamos, en primer lugar, si estas drogas afectaban de alguna manera la fijación, dependiente de EF-T y GTP, del aminoacil-tRNA correctamente codificado (Phe-tRNA) a ribosomas programados con ácido poliuridílico. Los experimentos de fijación se llevaron a cabo con dos tipos de preparaciones de Phe-tRNA, una de ellas proveniente de la aminoacilación de una mezcla de tRNAs de E. coli y la otra obtenida a partir de un tRNA purificado específico para fenilalanina. Los resultados de ambos experimentos se muestran en la Tabla 4.V (columnas A y B). En la columna A se observa que todos los antibióticos ensayados (representativos de los distintos grupos de aminoglicosídicos) inhibieron debilmente (entre un 20% y un 40%) la fijación de [^3H]Phe-tRNA no purificado a los ribosomas, con excepción de la estreptomycin con la que se obtuvo una inhibición superior al 50%. Sin embargo, cuando el ensayo de fijación se realizó usando [^{14}C]Phe-tRNA^{Phe} purificado (es decir, desprovisto de otros tRNAs), desapareció la debil inhibición observada en el experimento anterior y quedó fuertemente reducida la causada por la estreptomycin (columna B). Estos resultados parecen indicar que el efecto inhibidor observado al fijar [^3H]Phe-tRNA no purificado, no es debido a una interferencia directa de los antibióticos aminoglicosídicos con el proceso de fijación, sino que al inducir errores en la lectura del RNA mensajero, incrementan la competencia entre el [^3H]Phe-tRNA y otros tRNAs presentes en la mezcla de incubación.

Tabla 4.V.- Efecto de los antibióticos aminoglicosídicos en la fijación de Phe-tRNA a ribosomas, dependiente de EF-G y de GTP, y en la reacción de Ac [^{14}C] Phe-tRNA situado en el sitio P con la puromicina.

| Antibiótico | Concentración | Ac [^{14}C] Phe-pur. sintetizado | Phe-tRNA fijado | |
|----------------------------|---------------|--|-----------------|-----|
| | | | (A) | (B) |
| | μM | (% actividad) | | |
| Ninguno | --- | 100 | 100 | 100 |
| Neomicina B | 70 | 98 | 78 | 98 |
| Ribostamicina | 70 | --- | 63 | 100 |
| Neamina | 70 | 108 | 69 | 97 |
| Kanamicina A | 90 | 107 | 69 | 105 |
| Tobramicina | 70 | 95 | 60 | 106 |
| Gentamicina C ₁ | 70 | 96 | 79 | 101 |
| Estreptomicina | 80 | 95 | 45 | 87 |
| Bluensomicina | 80 | 91 | --- | --- |

La fijación de [^3H] Phe-tRNA conteniendo otros tRNAs (A) o de [^{14}C] Phe-tRNA^{Phe} que solo contiene tRNA específico para Phe (B) a ribosomas programados con poli(U), se realizó en mezclas de 20 μl como se describe en los apartados III.1.2. y III.1.3., respectivamente. La concentración de EF-T fué de 85 $\mu\text{g/ml}$ en (A) y de 45 $\mu\text{g/ml}$ en (B) y la fijación en ausencia del factor fué inferior al 7% de la obtenida en su presencia. El 100% representa 4,4 pmol de [^3H] Phe-tRNA (A) o bien 7,2 pmol de [^{14}C] Phe-tRNA^{Phe} (B), fijados por unidad óptica de

Tabla 4.V.- (continuación).

ribosomas. La formación del enlace peptídico se ensayó en ribosomas con Ac [^{14}C] Phe-tRNA previamente fijado en el sitio A, se preincubaron a 30°C durante 5 min con EF-G y GTP (previamente incubado en un sistema regenerante de energía) en una mezcla de 150 μl (apartado III.2.2.). A alícuotas de 15 μl de esta mezcla se les añadió 2 μl del antibiótico indicado y 1 min después 2 μl de puromicina 5 mM, continuando la incubación durante 2 min. El resto del experimento se llevó a cabo como se indica en el apartado III.6. El 100% representa 4 pmol de AcPhe-puromicina sintetizados por unidad óptica de ribosomas. A todos los valores se sustrajo un control de la formación de AcPhe-puromicina en ausencia de EF-G (fijación al sitio P).

IV.2.3. Inhibición por los antibióticos aminoglicosídicos de la translocación enzimática

Seguidamente examinamos el efecto de los distintos antibióticos aminoglicosídicos que poseíamos en la translocación enzimática. Para ello, analizamos, en presencia de concentraciones crecientes de estos compuestos, la reacción dependiente de EF-G y GTP del Ac [^{14}C] Phe-tRNA^{Phe} (previamente fijado en el sitio aceptor) con la puromicina.

La Figura 4.13 muestra las curvas de inhibición obtenidas; para facilitar su comparación, las hemos agrupado en cuatro paneles (A, B, C y D) según las similitudes estructurales de los antibióticos ensayados. A primera vista, se puede observar una clara gradación en cuanto a la extensión de la inhibición de la translocación del AcPhe-tRNA entre los cuatro grupos, y dentro de cada uno de ellos, entre los distintos antibióticos que los componen. Así, las neomicinas parecen ser mejores inhibidores que las kanamicinas y estas a su vez, mejores que las gentamicinas, siendo el grupo de la estreptomicina el que posee un efecto inhibidor más débil. Dentro de las neomicinas (panel A), observamos que la neomicina B y la C (ambas isómeros) fueron las más potentes en su acción, alcanzándose una inhibición del 90% a concentraciones comprendidas entre 5 y 10 μM . La ribostamicina, que carece de uno de los residuos neosamina de las neomicinas, causó una inhibición menor, siendo su potencia similar a la de la paromomicina. Este último compuesto es una mezcla de dos isómeros (paromomicinas I y II) idénticos a las neomicinas B y C excepto en que uno de los grupos-NH₂ de un residuo de neosamina es reemplazado por un grupo OH. La neamina, fué entre las neomicinas, el compuesto de acción más débil

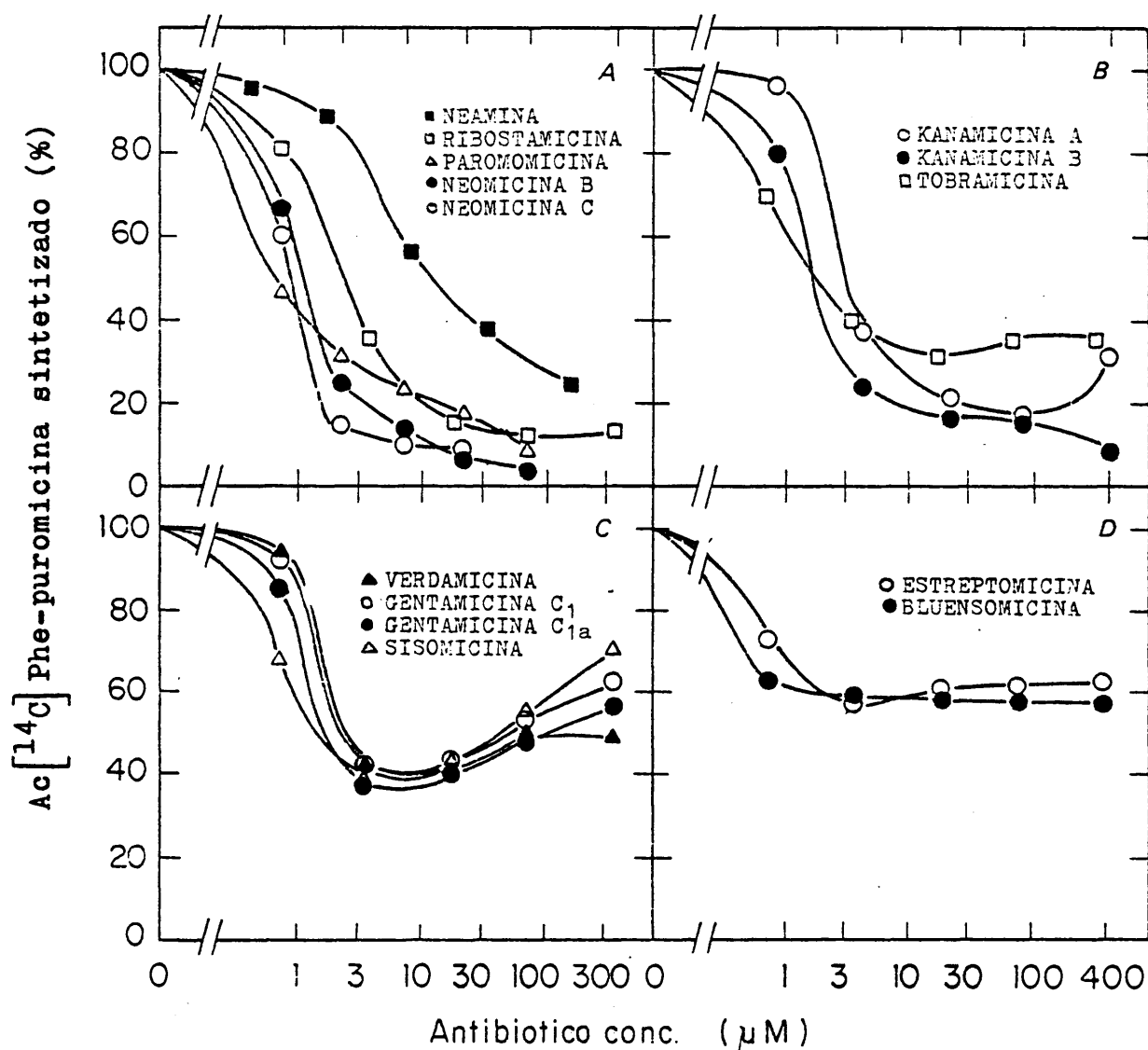


Figura 4.13.- Efecto de los antibióticos aminoglicosídicos en la síntesis de $\text{Ac}[^{14}\text{C}]\text{Phe-puromicina}$, dependiente de EF-G y GTP. El ensayo se llevó a cabo, como se describe en III.2.2, en mezclas de $20\ \mu\text{l}$ que se incubaron 2-4 min a 30°C .

requiriéndose concentraciones elevadas (del orden de $240 \mu\text{M}$) para conseguir una inhibición de 75%. Este antibiótico carece de un residuo de neosamina y de la D-ribosa de las neomicinas.

En el panel B, están representadas las curvas de inhibición de la translocación por las kanamicinas; la kanamicina A y la B (similar a la anterior pero con un grupo hidroxilo de un residuo aminoazúcar, sustituyendo a un grupo amino) fueron buenos inhibidores de este proceso, si bien menos potentes que las neomicinas B y C. La tobramicina, también llamada nebramicina factor 6 (Umezawa, 1975, revisión) es una 3' desoxikanamicina B y su potencia inhibidora es inferior a las anteriores, fundamentalmente a altas concentraciones del antibiótico en las que la inhibición alcanzada no sobrepasa el 70%.

Cuando observamos el efecto de las gentamicinas en la formación de AcPhe-puromicina dependiente de EF-G y GTP, encontramos unas curvas de inhibición inesperadas (panel C). Los cuatro antibióticos ensayados (gentamicina C_1 , gentamicina C_{1a} , sisomicina y verdamicina) fueron igualmente activos, presentando un máximo de inhibición (aproximadamente el 60%) a una concentración comprendida entre 3 y $10 \mu\text{M}$. A concentraciones más elevadas del antibiótico, hasta un máximo de $300 \mu\text{M}$, la inhibición disminuyó gradualmente. Estas sorprendentes curvas bifásicas pensamos que podían ser debidas a una estimulación por los antibióticos de la fijación del Ac $[^{14}\text{C}]$ Phe-tRNA libre presente en la mezcla de reacción, lo cual supondría un incremento en la síntesis de Ac $[^{14}\text{C}]$ Phe-puromicina. Para soslayar este problema, una vez fijado el Ac $[^{14}\text{C}]$ Phe-tRNA al sitio ribosómico aceptor, se purificó el complejo Ac $[^{14}\text{C}]$ Phe-ribosoma-poli(U) por filtración a través de una columna de Sepharosa 6B y, a continuación, se estudió en este complejo el efec-

to de los antibióticos en la translocación. Las curvas de inhibición obtenidas (resultados no mostrados) fueron idénticas a las representadas en el panel C, por lo que desechamos que la bifasicidad observada con estos antibióticos fuera artefactual.

En cuanto al grupo de la estreptomicina (panel D) podemos observar que tanto este antibiótico como la bluensomicina (químicamente relacionados) causaron una débil inhibición de la translocación (del orden del 40%) que no varió en un amplio rango de concentraciones, comprendido entre 1 y 400 μ M. Una débil inhibición de translocación por altas concentraciones de estreptomicina (0,5 mM) en un sistema similar al nuestro, ha sido previamente descrita por Igarashi y cols., 1969.

IV.2.4. Carencia de efecto de los antibióticos aminoglicosídicos sobre la peptidil-transferasa

Una vez observada la inhibición de la síntesis de AcPhe-puromicina por los compuestos aminoazucarados, verificamos que dicho efecto era debido a su interferencia con el proceso de translocación y no con la formación del enlace peptídico. Para ello, examinamos el efecto de estos antibióticos, a la concentración que se especifica en la Tabla 4.V, en la reacción del Ac [14 C] Phe-tRNA situado en el sitio P con la puromicina. Los resultados obtenidos indican que ninguno de los antibióticos ensayados afectan significativamente la actividad peptidil-transferasa del ribosoma. Estos resultados, sin embargo, discrepan de los publicados con anterioridad por otros autores (Suzuki y

cols., 1970; Pestka, 1972b) los cuales mostraban que la neomicina B y la kanamicina inhibían de forma significativa la formación del enlace peptídico. Esta discrepancia puede ser fácilmente explicable si tenemos en cuenta los diferentes sistemas experimentales empleados. En efecto, en el trabajo citado de Pestka, la neomicina inhibe a altas concentraciones la formación de peptidil- $[^3\text{H}]$ puromicina, en un extracto crudo de polisomas de E. coli no suplementados con factores de polimerización. En este extracto crudo puede tener lugar la translocación del peptidil-tRNA al sitio P promovida por las trazas del factor G presentes en la preparación de polisomas (el autor no descarta esta posibilidad) y, en tal caso, la inhibición de la síntesis de peptidil-puromicina observada, sería debida al efecto de los antibióticos en la traslocación y no a su acción sobre la peptidil-transferasa.

IV.2.5. Efecto de los antibióticos aminoglicosídicos en la polimerización de las cadenas nacientes en polisomas

En nuestro esfuerzo por definir la acción de los antibióticos aminoglicosídicos en el ciclo de polimerización, así como para investigar el significado de la inhibición de la translocación, observada en sistemas modelos, en la inhibición de la polimerización de las cadenas peptídicas, utilizamos un sistema de síntesis más fisiológico constituido por polisomas endógenos de E. coli suplementados con extracto S100 y una mezcla de los veinte aminoácidos. Como ya especificamos en el apartado IV.1.2.1, en este sistema tan solo se lleva a cabo el alargamiento de las cadenas nacientes de los ribosomas ya que, por carecer

de factores de iniciación, la iniciación de la síntesis de proteínas no tiene lugar.

Como un primer paso, estudiamos el efecto de las drogas en la polimerización de las cadenas peptídicas. Previamente buscamos las condiciones óptimas para la síntesis y la cinética de la incorporación de los aminoácidos. En la Figura 4.14, observamos que la polimerización de las cadenas transcurre rápidamente, alcanzándose las máximas cotas de incorporación de aminoácidos aproximadamente a los 7 min de incubación. De acuerdo con este resultado, para los posteriores ensayos de síntesis realizados en presencia de los antibióticos, elegimos tiempos de incubación en los que la incorporación de aminoácidos era todavía lineal.

Los primeros experimentos se llevaron a cabo con polisomas suplementados con $[^{14}\text{C}]$ valina como marcador, y los 19 aminoácidos restantes no marcados isotópicamente. Teniendo en cuenta que la valina representa el 5,5% del total de la proteína de E. coli, la cantidad total de aminoácidos incorporados se halla por un sencillo cálculo. Los resultados obtenidos, media de dos experimentos similares, se muestran en la Tabla 4.VI. En ella se puede apreciar que todos los antibióticos aminoglicosídicos ensayados, a las concentraciones que se indican en la Tabla, inhiben fuertemente la polimerización de las cadenas en polisomas. Sin embargo, esta fuerte inhibición observada podía ser exagerada. En efecto, los antibióticos aminoglicosídicos estimulan la incorporación de aminoácidos erróneamente codificados por el mensajero, existiendo una clara especificidad en cuanto al aminoácido erróneo incorporado (Davies y Davis, 1968). En trabajos anteriormente realizados en nuestro laboratorio se observó que la incorporación de valina, a

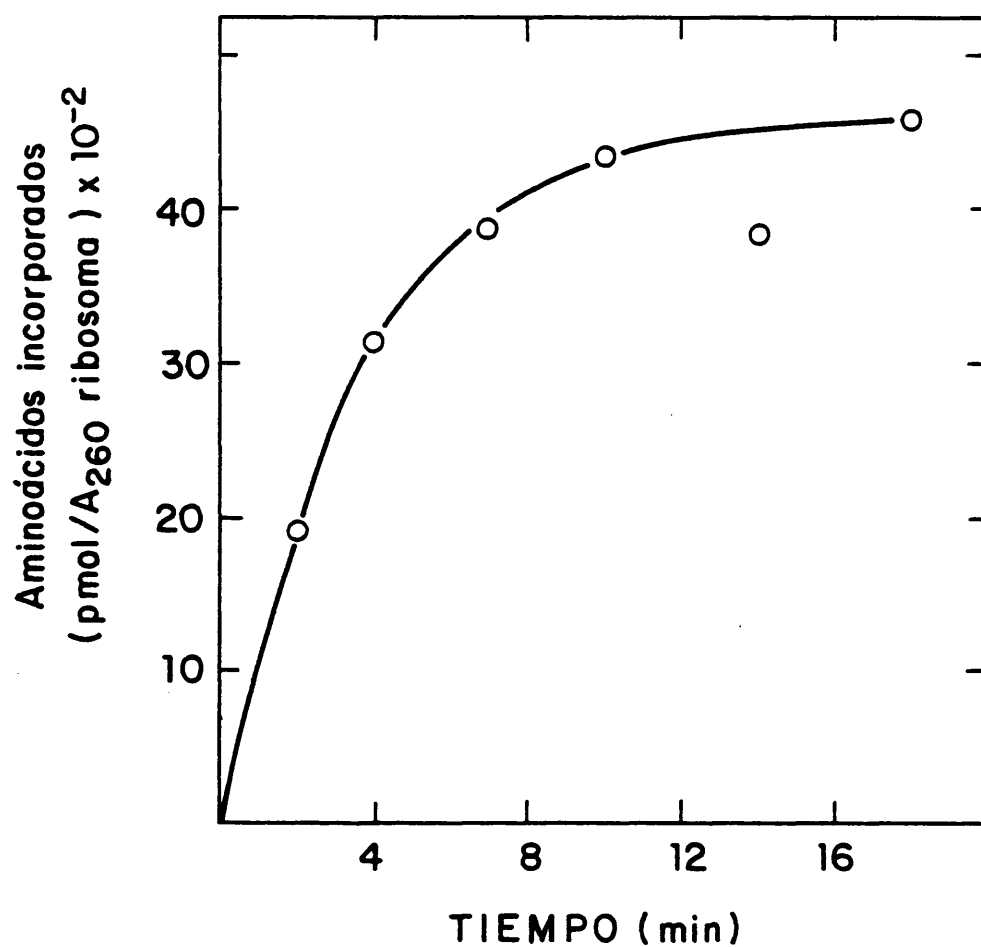


Figura 4.14.- Cinética de la síntesis polipeptídica en polisomas endógenos de *E. coli*. La incorporación de aminoácidos en las cadenas nacientes de polisomas se realizó tal como se indica en III.3.3. El valor obtenido a 0 min de incubación se restó de los resultados.

Tabla 4. VI.- Efecto de los antibióticos aminoglicosídicos en la síntesis polipeptídica en polisomas de E. coli, medida por la incorporación de ^{14}C -valina.

| Antibiótico | Concentración | Síntesis polipeptídica |
|-----------------------------|---------------|------------------------|
| | μM | (% actividad) |
| Ninguno | --- | 100 |
| Neomicina B | 70 | 12 |
| Neomicina C | 70 | 10 |
| Paromomicina | 70 | 30 |
| Ribostamicina | 70 | 18 |
| Neamina | 70 | 46 |
| Kanamicina A | 90 | 22 |
| Kanamicina B | 80 | 13 |
| Tobramicina | 70 | 16 |
| Gentamicina C_1 | 50 | 33 |
| Gentamicina C_{1a} | 50 | 30 |
| Sisomicina | 60 | 29 |
| Verdamicina | 50 | 31 |
| Estreptomicina | 300 | 38 |
| Bluensomicina | 300 | 54 |

El ensayo se realizó en mezclas de reacción de 20 μl , tal como se describe en III.3.3. El tiempo de incubación a 34°C fué de 4 min, consiguiéndose en el control sin antibiótico una incorporación de aminoácidos totales de 2177 pmol/ A_{260} de ribosomas (100% de actividad). El valor obtenido en una mezcla de reacción sin polisomas (inferior al 10% del control) se restó de todos los resultados.

diferencia de la de otros aminoácidos, se estimula pobremente en presencia de estos antibióticos. Por consiguiente, la polimerización en presencia de las drogas, calculada a partir de la incorporación de $[^{14}\text{C}]$ valina podía probablemente estar subestimada, consiguiéndose por ello inhibiciones superiores a las reales.

Este problema se evitó utilizando, en posteriores experimentos, una mezcla de 16 $[^{14}\text{C}]$ aminoácidos suplementada con los cuatro aminoácidos restantes no marcados isotopicamente. La Tabla 4.VII (columna A) muestra que todos los antibióticos ensayados inhibieron significativamente la polimerización polipeptídica, si bien el grado de inhibición fué inferior al obtenido en el experimento anterior (Tabla 4.VI). Los inhibidores más potentes fueron las neomicinas B y C (más del 90% de inhibición) y la kanamicina B, oscilando la inhibición causada por el resto de los antibióticos entre un 70% y un 30%.

Nuestro siguiente propósito fué averiguar si la inhibición de la polimerización de la cadena peptídica, observada en el sistema de polisomas, era realmente debida a la interferencia de los antibióticos aminoglicosídicos con la etapa de translocación detectada en un sistema modelo. Para ello, determinamos la posición del peptidil-tRNA en polisomas inhibidos durante la síntesis por la neomicina B, midiendo la formación de peptidil- $[^3\text{H}]$ puromicina. En este experimento, similar al realizado en el apartado IV.1.5.3. con la higromicina B, se usaron como controles polisomas bloqueados por la tetraciclina y la viomicina, ya que ambos antibióticos retienen el peptidil-tRNA en el sitio P y A respectivamente. En la Figura 4.15 se observa que en los polisomas inhibidos por la tetraciclina, el peptidil-tRNA reaccionó rápidamente con $[^3\text{H}]$ puromicina. Sin embargo, tan solo la mitad de los

Tabla 4.VII.- Efecto de los antibióticos aminoglicosídicos en la síntesis polipeptídica (detectada por la incorporación de $16 \text{ }^{14}\text{C}$ -aminoácidos) y en la formación de peptidil- $[\text{}^3\text{H}]$ puromicina, en polisomas de E. coli.

| Antibiótico | Concentración | Síntesis polipeptídica | Formación de peptidil- $[\text{}^3\text{H}]$ pur. |
|-----------------------------|---------------|---------------------------|--|
| | mM | (% actividad) | |
| Ninguno | --- | 100 | --- |
| Tetraciclina | 0,2 | --- | 100 |
| Viomicina | 0,1 | --- | 0 |
| Neomicina B | 0,07 | 8 | 16 |
| Neomicina C | 0,07 | 7 | -5 |
| Paromomicina | 0,07 | 49 | 61 |
| Ribostamicina | 0,07 | 33 | 69 |
| Neamina | 0,07 | 66 | 62 |
| Kanamicina A | 0,09 | 44 | 55 |
| Kanamicina B | 0,08 | 23 | 33 |
| Tobramicina | 0,07 | 34 | 51 |
| Gentamicina C_1 | 0,3 | 51 | 64 |
| Gentamicina C_{1a} | 0,3 | 36 | 77 |
| Sisomicina | 0,4 | 33 | 59 |
| Estreptomycin | 0,2 | 70 | 96 |

La síntesis polipeptídica en presencia de los antibióticos, se llevó a cabo tal como se describe en el apartado III.3.3., usando una mezcla de $16 \text{ }^{14}\text{C}$ -aminoácidos (18 cpm/pmol) e histidina, metionina, tirosina y cisteina no radiactivos, a la concentración de $12 \mu\text{M}$

Tabla 4.VII.- (continuación).

cada uno. Las mezclas se incubaron 4 min. El 100% representa la incorporación de 748 pmol de ^{14}C -aminoácidos por unidad óptica de ribosomas. La síntesis de peptidil- $[\text{}^3\text{H}]$ puromicina, se realizó esencialmente como se indica en el apartado III.4.1. Después de 3 min de incubación a 34°C , la síntesis polipeptídica en mezclas de $20\ \mu\text{l}$, se detuvo por la adición de $2\ \mu\text{l}$ del antibiótico que se indica y 45 s más tarde, se añadieron $2\ \mu\text{l}$ de $[\text{}^3\text{H}]$ puromicina $100\ \mu\text{M}$ ($780\ \text{cpm/pmol}$) continuando la incubación durante 2 min más. El peptidil- $[\text{}^3\text{H}]$ puromicina formado en las mezclas que contenían tetraciclina y viomicina ($5,7$ y $3,1\ \text{pmol}/\text{A}_{260}$ polisomas) se tomó como 100% y 0% respectivamente.

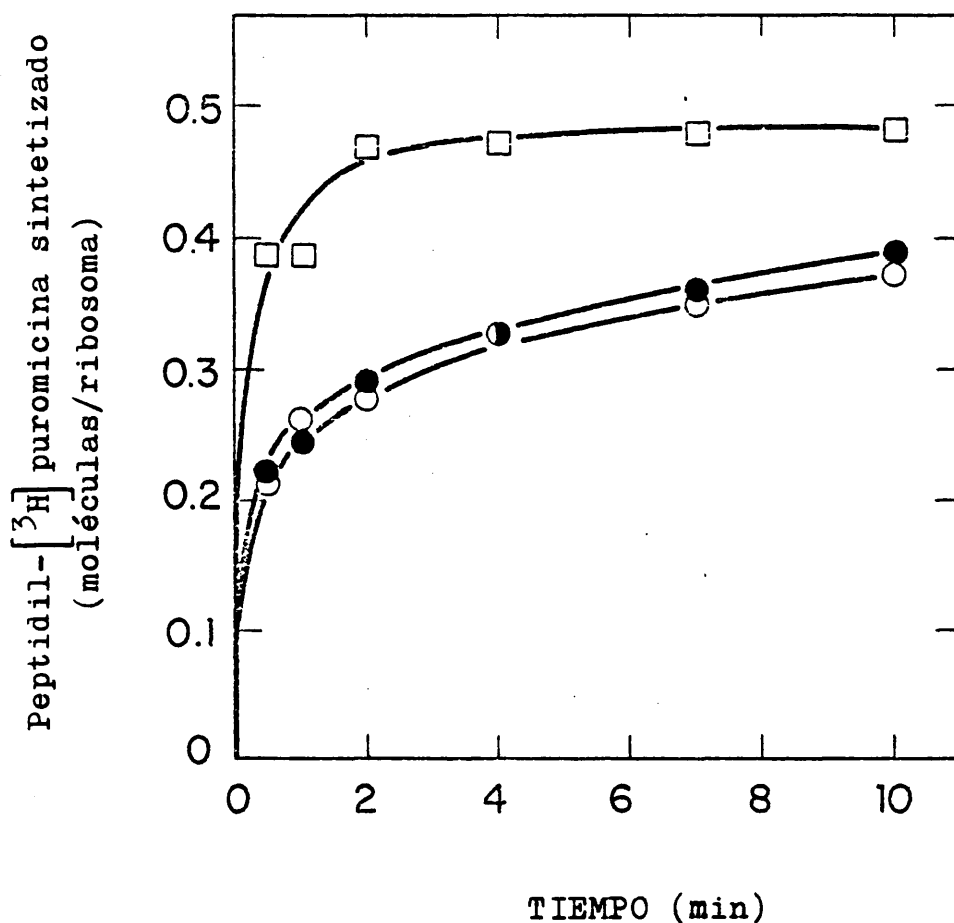


Figura 4.15.- Cinética de la formación de peptidil- ^3H puromicina en polisomas bloqueados durante la síntesis por 0,18 mM de tetraciclina (\square), 60 μM de neomicina B (\bullet) ó 90 μM de viomicina (\circ). El ensayo se realizó de forma análoga al de la figura 4.10. En los controles sin polisomas se obtuvieron 0,06 pmol de peptidil- ^3H puromicina, valor que se restó de los resultados.

polisomas bloqueados por la viomicina o la neomicina B (ambos presentan el mismo comportamiento) reaccionó rápidamente, mientras que el resto lo hace de forma más lenta debido, probablemente, a cierta translocación residual que, momentaneamente, situa al peptidil-tRNA en el sitio P, haciendo posible su reacción con la [^3H] puromicina. Como ya mencionamos al estudiar el efecto de la higromicina B en este sistema, desconocemos la razón por la cual en los polisomas bloqueados por la viomicina o la neomicina B tiene lugar inicialmente una significativa síntesis de peptidil- ^3H puromicina.

A continuación, examinamos la posición del peptidil-tRNA en polisomas bloqueados por otros antibióticos aminoglicosídicos. En este caso no estudiamos la cinética de la reacción del peptidil-tRNA con la [^3H] puromicina, sino que la reacción se detuvo a los 2 min de la acción de este compuesto, tiempo suficiente para que la síntesis de peptidil- ^3H puromicina en los polisomas bloqueados por la tetraciclina se haya completado y sea máxima la inhibición por la viomicina (Figura 4.15).

Los resultados se expresan en porcentaje de actividad, tomando como 100% y 0% de la síntesis de peptidil- ^3H puromicina los valores obtenidos con polisomas bloqueados durante la síntesis polipeptídica por la tetraciclina y la viomicina, respectivamente.

La Tabla 4.VII (columna B) muestra que a las concentraciones indicadas todos los antibióticos ensayados, con excepción de la estreptomicina, inhibieron significativamente la formación de peptidil- ^3H puromicina. Por consiguiente, podemos deducir que estas drogas retienen el peptidil-tRNA en el sitio A y cumpliendo este estricto requerimiento, pueden ser clasificadas como inhibidores de la transloca-

ción ribosómica. Las neomicinas B y C fueron los antibióticos más efectivos como inhibidores de este proceso, siendo tan potentes como la viomicina. La kanamicina B les siguió en efectividad y el resto de kanamicinas, neomicinas y gentamicinas fueron inhibidores más débiles. La estreptomicina se comportó esencialmente como la tetraciclina, por lo que concluimos que no es un inhibidor de la translocación en este sistema de polisomas. La misma observación fué publicada por Modolell y Davis en el año 1969.

Si comparamos las columnas A y B de la Tabla 4.VII observamos en general una buena correlación entre los grados de inhibición de la reacción de la puromicina y el de la polimerización de la cadena peptídica en polisomas. Esta última, sin embargo, parece ser algo más sensible a los antibióticos. En consecuencia, parece claro que la inhibición de la translocación es responsable, al menos parcialmente, de la inhibición de la síntesis polipeptídica.

IV.2.6. Discusión

Los antibióticos aminoglicosídicos pretenecientes a los grupos de la neomicina, kanamicina, gentamicina y estreptomicina, inhiben en mayor o menor medida el alargamiento de las cadenas peptídicas nacientes de polisomas endógenos de E. coli (Tablas 4.VI y 4.VII). Al estudiar en sistemas modelos simplificados el efecto de estas drogas en las distintas etapas del ciclo de polimerización de la síntesis hemos comprobado que, como la higromicina B, carecen de efecto en la fijación del Phe-tRNA^{Phe} purificado a ribosomas programados con

poli(U) y en la formación del enlace peptídico catalizado por la peptidil-transferasa. En contraste todos ellos impiden, más o menos eficientemente, la translocación del Ac [^{14}C] Phe-tRNA dependiente de EF-G y de GTP. Las curvas obtenidas al estudiar el efecto de la concentración de los antibióticos aminoglicosídicos en la inhibición de la translocación del AcPhe-tRNA, ponen de manifiesto la marcada relación existente entre la actividad y la estructura química de estos compuestos. Dicha relación ha sido observada con anterioridad por Benveniste y Davies (1973) al estudiar el efecto de estos antibióticos y de ciertos derivados en la síntesis de proteínas dirigida por mensajeros sintéticos o naturales, así como en la inducción de errores en la lectura del mensajero. Nuestras observaciones coinciden basicamente con las de estos autores. Efectivamente, dentro de los antibióticos ensayados son menos activos en la inhibición de la translocación los que contienen un residuo de estreptidina o bluensidina (la estreptomina y la bluensomicina) que aquellos que contienen un anillo de 2-deoxiestreptamina en su molécula (neomicinas, gentamicinas y kanamicinas). Dentro de este segundo grupo de compuestos, podemos distinguir dos subgrupos: los que poseen los sustituyentes del anillo de la deoxiestreptamina en posiciones adyacentes (tal es el caso de las neomicinas) son mejores inhibidores que aquellos compuestos que tienen sustituidos los grupos hidroxilos no adyacentes (como las kanamicinas y gentamicinas).

La actividad de los antibióticos aminoglicosídicos también parece estar relacionada con el número y localización de los grupos amino en la hexosa unida glicosídicamente a la posición 4 del anillo de la deoxiestreptamina, siendo más activos los compuestos que poseen

dos grupos amino que aquellos que solo tienen un grupo. Así, las neomicinas B y C son más activas que la paromomicina, y la kanamicina B es un inhibidor más potente que la kanamicina A. Otra característica estructural que confiere mayor o menor actividad a estos antibióticos es el número de anillos en su molécula. Concretamente, dentro del grupo de las neomicinas son más activas las que poseen cuatro anillos (neomicinas B y C y paromomicina) seguidas por las que tienen tres anillos (ribostamicina) y las de dos (neamina).

En cuanto al grupo de las gentamicinas, hemos encontrado que todas ellas (igualmente activas) muestran un complicado efecto bifásico de la concentración, en la inhibición de la translocación del AcPhe-tRNA. Recientemente, se ha observado en otros laboratorios, una similar respuesta multifásica de las gentamicinas en la incorporación de aminoácidos en dos sistemas de síntesis, en polisomas endógenos de E. coli que alargan sus cadenas nacientes o en ribosomas iniciantes que traducen el RNA mensajero del fago R17 (Tai y Davis, 1979; Kühberger y cols., 1979). En ambos sistemas la síntesis es máxima a bajas concentraciones de la droga y aumenta gradualmente al aumentar la concentración de la misma, hasta tal punto que entre 20 y 60 μM la incorporación total en el sistema de polisomas es tan alta como en ausencia del antibiótico. A partir de esta concentración la síntesis polipeptídica en ambos sistemas, vuelve a decrecer.

La más plausible explicación para este fenómeno, anticipadamente sugerida por Davies y Davis en 1968, es que las gentamicinas tienen más de un sitio de acción en el ribosoma. La neta estimulación de la translocación (en nuestro sistema) o de la incorporación de aminoácidos (en los sistemas de síntesis) en la segunda fase de la curva,

podría ser visualizada como una interacción entre los diferentes sitios de fijación del antibiótico al ribosoma, de tal modo que la fijación a los sitios de baja afinidad revertiría la inhibición causada por las moléculas del antibiótico fijadas a los sitios de alta afinidad.

Un trabajo posteriormente publicado por Zierhut y cols., (1979) demuestra que este modo multifásico de acción es también extensivo al resto de los aminoglicosídicos que poseen al residuo de 2-deoxiestreptamina (kanamicinas, neomicinas etc.) con excepción de la higromicina B. Según los autores, las posibles razones para esta excepción se apoyan en diferencias estructurales entre la higromicina B y el resto de los compuestos con deoxiestreptamina, por ejemplo, la N-metilación de este residuo en la higromicina B o el hecho de que tenga un solo enlace glicosídico en lugar de dos como en los otros compuestos. Esta diferencia de comportamiento de la higromicina B no se ha puesto de manifiesto en nuestros ensayos, como se aprecia en la primera parte de Resultados.

La segunda parte de nuestro trabajo con los antibióticos aminoglicosídicos ha consistido en comprobar que la inhibición de la translocación, observada en un sistema modelo, también ocurre en un sistema más fisiológico: los polisomas endógenos de E. coli que incorporan aminoácidos en sus cadenas nacientes. La adición a este sistema de los antibióticos (con excepción de la estreptomicina y la bluenomicina) inhibe la polimerización y bloquea al peptidil-tRNA en el sitio A. Por consiguiente, estas drogas interfieren con la translocación del peptidil-tRNA, siendo esta interferencia la causa (o al menos una de las causas) de su efecto inhibidor en el ciclo de polimerización.

Como ya vimos en el capítulo de Introducción (apartado I.2.1.2) los últimos trabajos publicados al respecto, localizan los sitios de fijación de los antibióticos aminoglicosídicos en ambas subunidades ribosómicas, 30S y 50S.

Los trabajos realizados en nuestro laboratorio por S. Cam-puzano sugieren que la interacción de la neomicina B y la kanamicina B con la subunidad 30S es la responsable de la inducción de errores en la lectura, mientras que la interacción de estos antibióticos con cualquiera de las dos subunidades (30S ó 50S) causa la inhibición de la translocación, debido probablemente a que este proceso implica un reordenamiento coordinado de ambas subpartículas.

Independientemente del sitio de fijación, y como ya indicamos al estudiar el efecto de la higromicina B (apartado IV.1.8), la doble acción de los antibióticos que contienen deoxiestreptamina en las etapas de translocación y de reconocimiento del aminoacil-tRNA, sugiere una estrecha relación entre los componentes ribosómicos implicados en cada una de ellas.

IV.3. Incorporación en cadenas peptídicas del Tyr-tRNA^{Tyr}, fijado a ribosomas programados con poli(U)

IV.3.1. Introducción

Hemos mencionado en repetidas ocasiones que los antibióticos aminoglicosídicos inducen errores en la lectura del mensaje genético. Durante la última década se han realizado numerosos estudios concernientes a la especificidad del aminoácido erróneamente codificado, a las bases estructurales de los antibióticos que inducen su incorporación, y a los componentes ribosómicos implicados en el control de la fidelidad de la traducción (Vázquez, 1979 y Pestka, 1977; revisión). Sin embargo, los mecanismos moleculares que conducen a la incorporación en una cadena peptídica de un aminoacil-tRNA erróneamente codificado por el mensajero, son todavía poco conocidos.

En nuestro laboratorio, se ha estudiado recientemente por S. Campuzano la fijación de un aminoacil-tRNA erróneo (Tyr-tRNA^{Tyr}) a ribosomas programados con poli(U), comparándola con la del correctamente codificado (Phe-tRNA^{Phe}). Se ha comprobado que en esta fijación errónea deben estar presentes ambas subunidades ribosómicas, el factor de polimerización T, GTP, iones NH_4^+ y un antibiótico aminoglicosídico, siendo máxima a una concentración de Mg^{++} de 10 mM. A pesar de las sugestivas diferencias encontradas, el mecanismo de fijación del Tyr-tRNA^{Tyr} parece ser muy similar al del aminoacil-tRNA codificado, Phe-tRNA^{Phe}.

Una vez fijado a los ribosomas, quedaba por elucidar como

se comporta el aminoacil-tRNA erroneamente codificado en las siguientes etapas del ciclo de polimerización que da lugar a la síntesis de una cadena protéica. Por ello, hemos fijado el Tyr-tRNA^{Tyr} a ribosomas programados con poli(U) a los que, previamente, se había fijado AcPhe-tRNA en el sitio donador, estudiando a continuación la formación de enlace peptídico entre los dos aminoacil-tRNAs y la translocación, en presencia del factor G, del peptidil-tRNA formado.

IV.3.2. La fijación del Tyr-tRNA^{Tyr} tiene lugar en el sitio aceptor del ribosoma

Los datos obtenidos en nuestro laboratorio por S. Campuzano, sugerían que la fijación de Tyr-tRNA^{Tyr} a ribosomas programados con poli(U) ocurre en el sitio aceptor ya que dicha fijación es fuertemente dependiente del factor T y de GTP y se inhibe por la tetraciclina (un antibiótico que impide específicamente la fijación a este sitio ribosómico). Sin embargo, la mejor prueba de que el Tyr-tRNA^{Tyr} se fija al sitio aceptor en una posición correcta consiste en examinar su capacidad para ser sustrato aceptor de la reacción de la peptidil-transferasa. Para ello, realizamos un experimento en el que partimos de ribosomas dirigidos por poli(U), a los que se fijó Ac [¹⁴C] Phe-tRNA^{Phe} en el sitio A y que posteriormente se translocó al sitio P. El factor G, el nucleótido de guanosina y otros compuestos no fijados a los ribosomas, se eliminaron de la mezcla de reacción por filtración a través de una columna de Sepharosa 6B. A continuación, al complejo ribosoma·poli(U)·Ac [¹⁴C] Phe-tRNA, se fijó [³H] Tyr-tRNA^{Tyr} o bien

$[^3\text{H}]$ Phe-tRNA en presencia de neomicina B o estreptomicina a las concentraciones de $3\ \mu\text{M}$ y $4\ \mu\text{M}$, respectivamente. Una vez fijado el aminoacil-tRNA (lo cual se comprobó filtrando una alícuota de las mezclas a través de filtros de nitrocelulosa) se procedió a la hidrólisis alcalina de las mezclas y después de la acidificación con HCl, se sometieron a extracción con acetato de etilo. A pH ácido, la extracción en este solvente orgánico es selectiva para el $\text{Ac } [^{14}\text{C}] \text{ Phe}$ y $\text{Ac } [^{14}\text{C}] \text{ Phe}-(\text{aa})_n$, es decir, los compuestos que tienen bloqueado el $-\text{NH}_2$ terminal (Leder y Bursztyn, 1966). Los productos extraídos se analizaron por electroforesis en papel.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.VIII y revelan que en presencia de uno u otro antibiótico, aproximadamente la mitad del $\text{Ac } [^{14}\text{C}] \text{ Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ fijado a los ribosomas reaccionó con el $[^3\text{H}] \text{ Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ dando lugar a $\text{Ac } [^{14}\text{C}] \text{ Phe}-([^3\text{H}] \text{ Tyr})_n\text{-tRNA}^{\text{Tyr}}$. En cuanto al $[^3\text{H}] \text{ Phe-tRNA}$, los resultados de la Tabla 4.VIII indican que dicho sustrato también incorporó del orden del 50% de la radiactividad ^{14}C para dar $\text{Ac } [^{14}\text{C}] \text{ Phe}-([^3\text{H}] \text{ Phe})_n\text{-tRNA}$. Teniendo en cuenta que en presencia de la estreptomicina (aunque no de la neomicina B) se fijó la misma cantidad de Tyr-tRNA que de Phe-tRNA (ver la leyenda de la Figura), los resultados sugieren que estos compuestos son igualmente buenos sustratos en la reacción de la peptidil-transferasa. Por consiguiente, dedujimos que el aminoacil-tRNA erróneamente codificado, del mismo modo que el correctamente codificado, se fija de forma correcta en el sitio aceptor de los ribosomas.

La Tabla 4.VIII también muestra que la ausencia de los antibióticos no incrementa significativamente la cantidad de $\text{Ac } [^{14}\text{C}] \text{ Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ que forma oligopéptidos con el $[^3\text{H}] \text{ Phe-tRNA}$ (línea 5).

Tabla 4.VIII.- Síntesis de Acetil-oligopéptidos obtenida por la adición de $[^3\text{H}]\text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ o $[^3\text{H}]\text{Phe-tRNA}$ a ribosomas programados con poli(U) y $\text{Ac}[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ fijado en el sitio P.

| aa-tRNA | Antibiótico | Radiactividad ^{14}C recuperada como $\text{Ac} \left[^{14}\text{C} \right] \text{Phe} - \left(\left[^3\text{H} \right] \text{aa} \right)_n$ | | | |
|---|----------------|---|-----|-----|-----|
| | | n=0 | n=1 | n=2 | n>2 |
| | | % | | | |
| $\left[^3\text{H} \right] \text{Tyr-tRNA}$ | estreptomicina | 52 | 30 | 8 | 10 |
| $\left[^3\text{H} \right] \text{Tyr-tRNA}$ | neomicina B | 53 | 38 | 4 | 5 |
| $\left[^3\text{H} \right] \text{Phe-tRNA}$ | estreptomicina | 45 | 49 | 5 | 1 |
| $\left[^3\text{H} \right] \text{Phe-tRNA}$ | neomicina B | 50 | 44 | 5 | 1 |
| $\left[^3\text{H} \right] \text{Phe-tRNA}$ | ninguno | 37 | 52 | 8 | 3 |

El ensayo se realizó como se describe en el texto (IV.3.2).

La mezcla de translocación del AcPhe-tRNA al sitio P (330 1) conténia, además de lo especificado en III.2.2., 27 A_{260} de ribosomas por ml complejados con 8 pmol de $\text{Ac}[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ por A_{260} de ribosomas y 30 μg por ml de EF-G. Después de incubar 10 min a 30°C , se filtró la mezcla a través de una columna de Sepharosa 6B (apartado III.1.6.). Al complejo $\text{AcPhe-tRNA}\cdot\text{ribosoma}\cdot\text{poli(U)}$, eluido de la columna, se fijó el aminoacil-tRNA que se indica en la Tabla, en mezclas de 125 μl que contenían KCl 40 mM, NH_4Cl 35 mM, MgAc_2 10 mM, 2-ME 5 mM, GTP 0,13 mM, EF-T 14 $\mu\text{g/ml}$, estreptomicina 4 μM o neomicina B 3 μM , $[^3\text{H}]\text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ 0,35 μM o bien $[^3\text{H}]\text{Phe-tRNA}$ 0,3 μM y 20 pmol de ribo-

Tabla 4.VIII.- (continuación).

somas con 7,8 pmol de Ac [^{14}C] Phe-tRNA fijados. Después de incubar 10 min a 30°C, se determinó la cantidad de aminoacil-tRNA fijado a los ribosomas en un alícuota de 40 μl de las mezclas (III.1.1.). Otra porción de 80 μl se sometió a hidrólisis alcalina y posteriormente a electroforesis en papel, siguiendo el método descrito en III.5. El 100% representa 2600-2900 cpm de ^{14}C recuperadas después de la electroforesis. La cantidad de [^3H]Tyr-tRNA^{Tyr} y [^3H]Phe-tRNA fijado a los ribosomas fué de 0,30 y 0,27 moléculas/ribosoma con estreptomina y 0,47 y 0,32 moléculas/ribosoma con neomicina B, respectivamente. En ausencia de los antibióticos se fijaron 0,39 moléculas de [^3H]Phe-tRNA/ribosoma.

Sorprendentemente, en presencia de los antibióticos, se observó una síntesis de tripéptidos y oligopéptidos mayores, sustancialmente superior con $[^3\text{H}]\text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ que con $[^3\text{H}]\text{Phe-tRNA}$. La explicación de este interesante hecho la encontraremos en los siguientes apartados.

IV.3.3. Translocación espontánea del peptidil-tRNA erroneamente codificado

Una vez formado el enlace peptídico entre la porción AcPhe del AcPhe-tRNA^{Phe} situado en el sitio ribosómico P y el Tyr-tRNA^{Tyr} fijado al sitio A, decidimos investigar en el mismo sistema el comportamiento del producto de la reacción AcPhe-Tyr-tRNA^{Tyr} en la siguiente etapa del ciclo de polimerización, la translocación, y compararlo con el del dipeptidil-tRNA correctamente codificado el Ac(Phe)₂-tRNA^{Phe}. Como la fijación del Tyr-tRNA^{Tyr} requiere la presencia de un antibiótico aminoglicosídico y la mayor parte de estos compuestos interfieren con la etapa de translocación, utilizamos en estos experimentos la estreptomicina, por ser de todos ellos el que presenta un efecto inhibidor más débil en esta etapa de la síntesis (ver Figura 4.13 y Tabla 4.VII).

El experimento se llevó a cabo tal como se ha especificado en el apartado anterior. Pero después de la fijación de o bien $[^3\text{H}]\text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ o $[^3\text{H}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$, se promovió la translocación del peptidil-tRNA formado, mediante la adición de EF-G y GTP, y se determinó su posición por la reacción con la puromicina. En paralelo se llevaron controles de lo reaccionado con la puromicina en ausencia del factor,

así como de la radiactividad extraíble en ausencia de la puromicina (este último, se restó de todos los valores obtenidos).

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.IX en la que observamos que, después de la fijación de $[^3\text{H}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ a los ribosomas que contienen $\text{Ac}[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ en el sitio P, tan solo una pequeña parte del dipeptidil formado ($\text{Ac}[^{14}\text{C}]\text{Phe}-[^3\text{H}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$) reaccionó con la puromicina en ausencia de EF-G, indicando que la mayor parte de este compuesto estaba localizada en el sitio ribosómico A (Tabla 4.IX, línea 2). La adición del factor G promovió la translocación cuantitativa de este peptidil-tRNA al sitio P, puesto que todo el producto marcado en ^{14}C , fijado al ribosoma, reaccionó con la puromicina (línea 3). La Tabla 4.IX muestra además que en presencia de EF-G el material marcado en ^3H reactivo con la puromicina, fué dos veces superior al marcado en ^{14}C (línea 3), lo cual indica que algo de polimerización de las cadenas peptídicas tuvo lugar antes de que el dipeptidil-tRNA fuera liberado de los ribosomas por la puromicina. Esta interpretación de los resultados se corroboró analizando por electroforesis en papel la naturaleza de los productos que reaccionaron con puromicina. En la parte derecha de la Tabla 4.IX se observa que en su mayor parte estos productos fueron $\text{Ac}[^{14}\text{C}]\text{Phe}-([^3\text{H}]\text{Phe})_{n \geq 1}$ -puromicina, tal como esperábamos.

Sin embargo, los resultados fueron sorprendentes al estudiar la translocación del peptidil-tRNA erróneamente codificado. El $\text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ se fijó bien al complejo $\text{Ac}[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$.ribosoma. •poli(U), pero en contraste al peptidil-tRNA codificado el cual requería la presencia de EF-G para su translocación, el $\text{Ac}[^{14}\text{C}]\text{Phe}-[^3\text{H}]\text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ sintetizado durante la fijación del $[^3\text{H}]\text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$

Tabla 4.IX.- Fijación de $[^3\text{H}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ y $[^3\text{H}]\text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ al complejo $\text{Ac } [^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}\cdot\text{ribosoma}\cdot\text{poli(U)}$ y reacción con la puromicina de los productos formados después de la fijación.

| | $\text{Ac } [^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}$ | $[^3\text{H}]\text{Phe-tRNA}$ | $[^3\text{H}]\text{Tyr-tRNA}$ | $\text{Ac } [^{14}\text{C}]\text{Phe-pur.}$ | $\text{Ac } [^{14}\text{C}]\text{Phe-(aa)}_{n\geq 1}\text{-pur.}$ |
|--------------------------------|---|-------------------------------|-------------------------------|---|---|
| | moléculas/ribosoma | | | % | |
| fijado a ribosomas | 0,24 | 0,28 | --- | --- | --- |
| reactivo con puromicina | 0,06 | 0,05 | --- | --- | --- |
| reactivo con puromicina + EF-G | 0,24 | 0,59 | --- | 16 | 84 |
| fijado a ribosomas | 0,17 | --- | 0,22 | --- | --- |
| reactivo con puromicina | 0,16 | --- | 0,14 | --- | --- |
| reactivo con puromicina + EF-G | 0,16 | --- | 0,16 | 57 | 43 |

El experimento se realizó tal como se explica en la Tabla 4.VIII. Una vez fijado el $[^3\text{H}]\text{Phe-tRNA}$ o el $[^3\text{H}]\text{Tyr-tRNA}$ en presencia de estreptomicina $4\text{ }\mu\text{M}$, en mezclas de reacción de $200\text{ }\mu\text{l}$, se determinó en porciones de $30\text{ }\mu\text{l}$ (por duplicado) la cantidad de radiactividad ^{14}C y ^3H fijada a los ribosomas. Otras porciones de $40\text{ }\mu\text{l}$ se suplementaron con $0,5\text{ mM}$ de puromicina y después de incubar a 30°C durante 10 min se analizó el $\text{Ac } [^{14}\text{C}]\text{Phe-}([^3\text{H}]\text{aa})_{n\geq 0}\text{-puromicina}$ sintetizado

Tabla 4.IX.- (continuación).

por extracción a pH 5 en acetato de etilo. Por último, porciones de 100 μ l se suplementaron con 0,5 mM de puromicina, 0,1 mM de GTP y 40 μ g/ml de EF-G y después de incubar 10 min a 30°C se detuvo la reacción con 250 μ l de NaAc (pH 5,0). El Ac [14 C] Phe-([3 H] aa)_{n>0}-puromicina sintetizado se extrajo con 0,65 ml de acetato de etilo. 0,2 ml de la fase orgánica se contaron de la forma usual y 0,4 ml se sometieron a electroforesis en acetato de piridina (pH 3,5) como se indica en III.5. El 100% representa 950 cpm y 740 cpm de radiactividad 14 C, recuperada del papel electroforético en los experimentos con [3 H] Phe-tRNA^{Phe} y [3 H] Tyr-tRNA^{Tyr}, respectivamente.

no precisó del factor G para reaccionar con la puromicina. La Tabla 4.IX (línea 4 y 5) muestra que prácticamente todo el material ^{14}C fijado a los ribosomas y una parte considerable del material marcado en ^3H , reaccionaron con el antibiótico en ausencia de EF-G. Este resultado sugiere que después de la síntesis, el peptidil-tRNA erróneamente codificado, AcPhe-Tyr-tRNA^{Tyr} no quedó retenido en el sitio A sino que, sin la participación de EF-G, pasó a ocupar presumiblemente el sitio P. De acuerdo con esta suposición, la adición del factor G no modificó la cantidad de radiactividad (^{14}C o ^3H) liberada del ribosoma por la puromicina (línea 6).

Existía la posibilidad de que el resultado obtenido fuera debido a que el Ac [^{14}C] Phe-tRNA^{Phe} y el [^3H] Tyr-tRNA^{Tyr} no hubieran formado el dipéptido y la puromicina reaccionara por separado con estos ligandos. Esta posibilidad fué desechada al analizar por electroforesis el producto de la reacción de la puromicina, ya que aproximadamente la mitad del mismo fué Ac [^{14}C] Phe-([^3H] Tyr)_{n>1}-puromicina (línea 6). Además hay que indicar que en las condiciones en que se hizo la extracción, con acetato de etilo, el [^3H] Tyr-puromicina no era extraíble.

Se debe hacer hincapie en que es muy improbable que la translocación del AcPhe-Tyr-tRNA^{Tyr} resultara de una contaminación de nuestro sistema con el factor G, debida a una incompleta eliminación del mismo en la filtración a través de la columna de Sepharosa 6B, o a la presencia de trazas del factor en la preparación de ribosomas o de EF-T, usada en el experimento. Las siguientes razones rechazan esta suposición: a) El dipeptidil-tRNA correctamente codificado, en una mezcla de reacción paralela, no translocaba a menos de que el

factor G se añadiera a la mezcla (líneas 2 y 3), b) la preparación de EF-T usada en el experimento era homogénea, como se comprobó por electroforesis en gel de poliacrilamida, en dodecil sulfato sódico y c) la translocación no enzimática del dipeptidil-tRNA erroneamente codificado, se observó en repetidos experimentos no solo con ribosomas que habían sido tratados con EF-G durante la fijación del AcPhe-tRNA, sino también con ribosomas que fijaron AcPhe-tRNA directamente al sitio P y que, por consiguiente, no habían sido expuestos al factor.

Razonamos además que quizás esta translocación no enzimática ocurriera por el desprendimiento al medio del dipeptidil-tRNA erroneamente codificado y su subsiguiente fijación al sitio P del ribosoma (ver apartado siguiente). Sin embargo en datos no presentados, comprobamos que después de fijar Tyr-tRNA^{Tyr} al complejo AcPhe-tRNA·ribosoma·poli(U), la adición a la mezcla de reacción de un exceso de ribosomas (complejados con poli(U)), no incrementó la cantidad de AcPhe-Tyr-tRNA^{Tyr} reactiva con la puromicina; es decir, no hubo posterior fijación de este ligando a los ribosomas con el sitio P vacante. Por otra parte, comprobamos que el AcTyr-tRNA^{Tyr} se fija muy pobremente (y solo en posiciones no reactivas con la puromicina) a los ribosomas programados con poli(U).

IV.3.4. Desprendimiento espontáneo del peptidil-tRNA erroneamente codificado del ribosoma

En todos los experimentos de fijación del Tyr-tRNA^{Tyr} a ribosomas que contenían Ac [¹⁴C] Phe-tRNA^{Phe}, habíamos observado que des-

pués de la fijación decrecía significativamente (entre un 30 y un 40%) la cantidad de material marcado en ^{14}C fijado a los ribosomas. Este efecto, que quedó patente en el experimento de la Tabla 4.IX (comparar las líneas 1 y 4), se muestra con más detalle en la Figura 4.16. Esta Figura representa la cinética de fijación de $[^3\text{H}]\text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ y de $[^3\text{H}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$, en mezclas paralelas, a ribosomas que contenían $\text{Ac}[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ en el sitio P y la retención por los mismos del material marcado con ^{14}C . Observamos que la fijación de ambos aminoacil-tRNAs al ribosoma, transcurre paralelamente. Sin embargo, durante la fijación del sustrato erróneamente codificado, $\text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$, parte de la radiactividad ^{14}C se desprendió de los ribosomas y, por consiguiente, no quedó retenido en los filtros Millipore. Este desprendimiento tuvo lugar en los primeros minutos de la reacción, cuando la velocidad de fijación del $\text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ era máxima, y no se observó en la fijación del aminoacil-tRNA correctamente codificado $[^3\text{H}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$.

Decidimos investigar si los productos marcados en ^{14}C (cualquiera que fuera su naturaleza) se desprendían del ribosoma asociados a tRNA o bien pasaban al medio por efecto de alguna acción hidrolítica que rompiera el enlace ester entre el aminoácido o péptido y el tRNA. Para ello, realizamos un experimento de fijación de $[^3\text{H}]\text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ a ribosomas complejados con $\text{Ac}[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ en el sitio P, y a distintos intervalos de tiempo, analizamos en el filtrado el material precipitable en ácido tricloroacético frío al 10%. En la Tabla 4.X se observa que toda la radiactividad ^{14}C presente en el filtrado estaba unida presumiblemente a tRNA, puesto que precipitó cuantitativamente en TCA frío.

Por otra parte, comprobamos (datos no presentados) que los

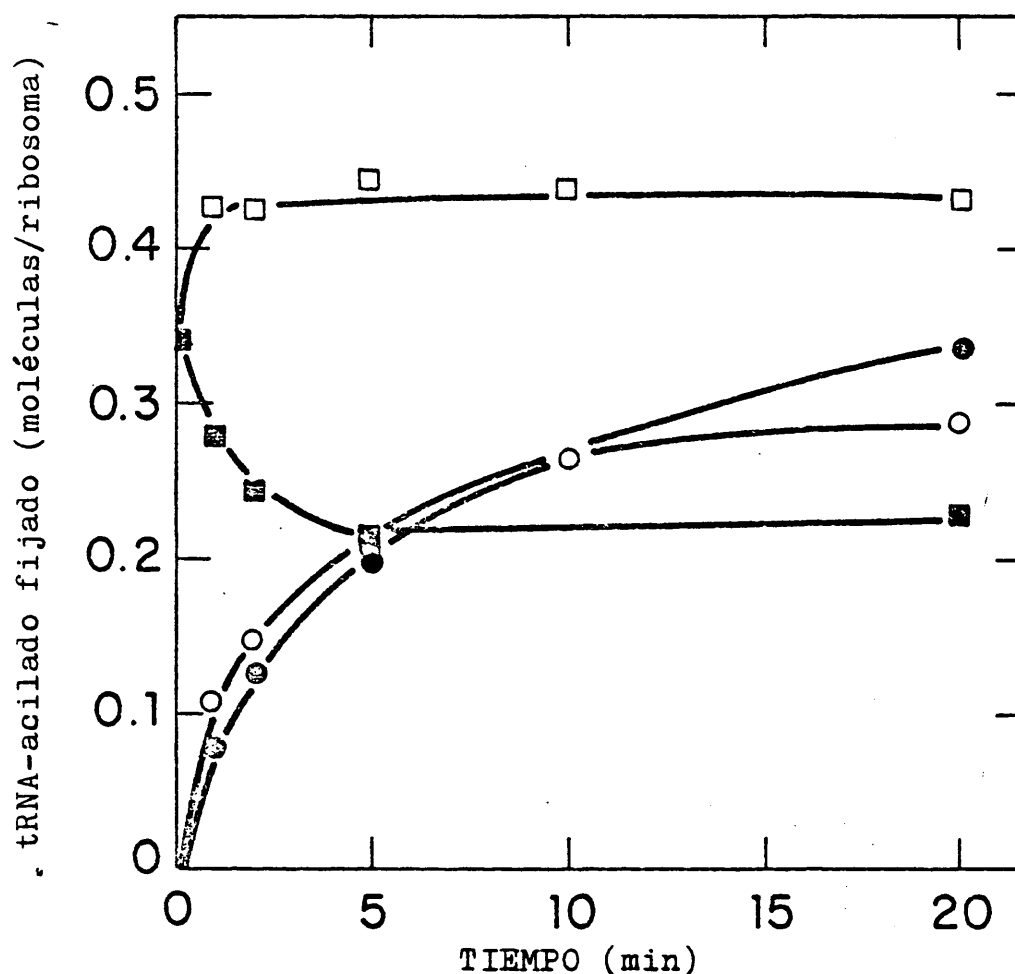


Figura 4.16.- Efecto de la fijación de $[\text{}^3\text{H}]$ Phe-tRNA^{Phe} o $[\text{}^3\text{H}]$ Tyr-tRNA^{Tyr} al sitio ribosómico A, en la retención por los ribosomas del Ac $[\text{}^{14}\text{C}]$ Phe-tRNA^{Phe} situado en el sitio P. El experimento se llevó a cabo de forma similar al de la Tabla 4.IX. El $[\text{}^3\text{H}]$ aminoacil-tRNA fijado al complejo Ac $[\text{}^{14}\text{C}]$ Phe-tRNA^{Phe}.ribosoma.poli(U), se determinó a los tiempos indicados en alícuotas de 30 μl de la mezcla, por filtración a través de filtros de nitrocelulosa. Los símbolos representan: (○) fijación de $[\text{}^3\text{H}]$ Phe-tRNA^{Phe}; (●) fijación de $[\text{}^3\text{H}]$ Tyr-tRNA^{Tyr}; (□) o (■), material marcado con ^{14}C que permanece en los ribosomas después de fijar el $[\text{}^3\text{H}]$ Phe-tRNA^{Phe} o $[\text{}^3\text{H}]$ Tyr-tRNA^{Tyr}.

Tabla 4.X.- Análisis por precipitación en TCA 10% frío de los productos marcados con ^{14}C , desprendidos al fijar $[^3\text{H}]\text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ al complejo $\text{Ac } [^{14}\text{C}] \text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}} \cdot \text{ribosoma} \cdot \text{poli(U)}$.

| Tiempo incubación | $[^3\text{H}]\text{Tyr-tRNA}$ fijado | Productos marcados con ^{14}C | | |
|----------------------|---|--|--------------------|-----------------------------|
| | | Desprendido | Filtrado (Bray) | Precipitable en TCA frío |
| min | pmol/ribosoma | % | cpm | |
| 1 | 0,25 | 18,1 | 843 | 1010 |
| 2 | 0,32 | 26,4 | 989 | 1185 |
| 5 | 0,44 | 41,6 | 1419 | 1617 |

La fijación de $[^3\text{H}]\text{Tyr-tRNA}$ al complejo se realizó en presencia de estreptomicina $6 \mu\text{M}$ en mezclas de 0,48 ml como se describe en III.5. A los tiempos indicados, se detuvo la reacción en porciones de 0,15 ml de la mezcla tal como se indica en Métodos. En una parte del filtrado (0,35 ml) se determinó la radiactividad por el método usual de conteo y a otra porción (1,25 ml) se añadió 0,125 ml de TCA 100% y 200 μg de BSA. El precipitado se analizó por filtración en GF/A. El desprendimiento del material marcado en ^{14}C se midió por la disminución de radiactividad fijada a los filtros Millipore y el 100% representa 0,23 pmol por ribosoma.

productos precipitados en TCA frío eran solubles en TCA caliente al 10%, por lo cual descartamos la posibilidad de que estos productos no estuvieran asociados a tRNA sino que fueran cadenas polipeptídicas de gran longitud, libres de tRNA, que también precipitan en TCA frío.

Seguidamente analizamos por la técnica de electroforesis en papel la composición del material desprendido de los ribosomas y la del que permanece fijado a los mismos. Para ello, en un experimento de fijación similar a los descritos se recuperó este material de los filtrados y de los filtros Millipore, respectivamente, se sometió a hidrólisis alcalina y se analizó por electroforesis en papel (ver apartado III.5. de Métodos).

Los resultados se representan en la Figura 4.17. El cálculo de las proporciones relativas de los compuestos analizados en la electroforesis, se realizó en función de las cpm de ^{14}C , debido a la baja eficiencia del tritio en el papel electroforético. En la Figura 4.17, observamos que la fijación de $[\text{}^3\text{H}]\text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ provocó que el 40% de los productos marcados en ^{14}C se desprendieran del ribosoma, fundamentalmente como $\text{Ac}[\text{}^{14}\text{C}]\text{Phe}-[\text{}^3\text{H}]\text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$. Del material que permaneció fijado a los ribosomas aproximadamente el 60% era $\text{Ac}[\text{}^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}$ y el resto estaba en forma de $\text{Ac}[\text{}^{14}\text{C}]\text{Phe}-([\text{}^3\text{H}]\text{Tyr})_{n\geq 1}\text{-tRNA}^{\text{Tyr}}$, lo cual está de acuerdo con la composición de los productos que reaccionaron con la puromicina, mostrada en la Tabla 4.IX (línea 6). Por otra parte, más de una 3ª parte de este peptidil-tRNA erróneamente codificado tiene dos o más residuos de tirosina, demostrando que una parte sustancial de las moléculas del peptidil-tRNA fijado a los ribosomas, ha sufrido más de un ciclo de translocación espontánea.

La Figura 4.17 también muestra los resultados obtenidos en

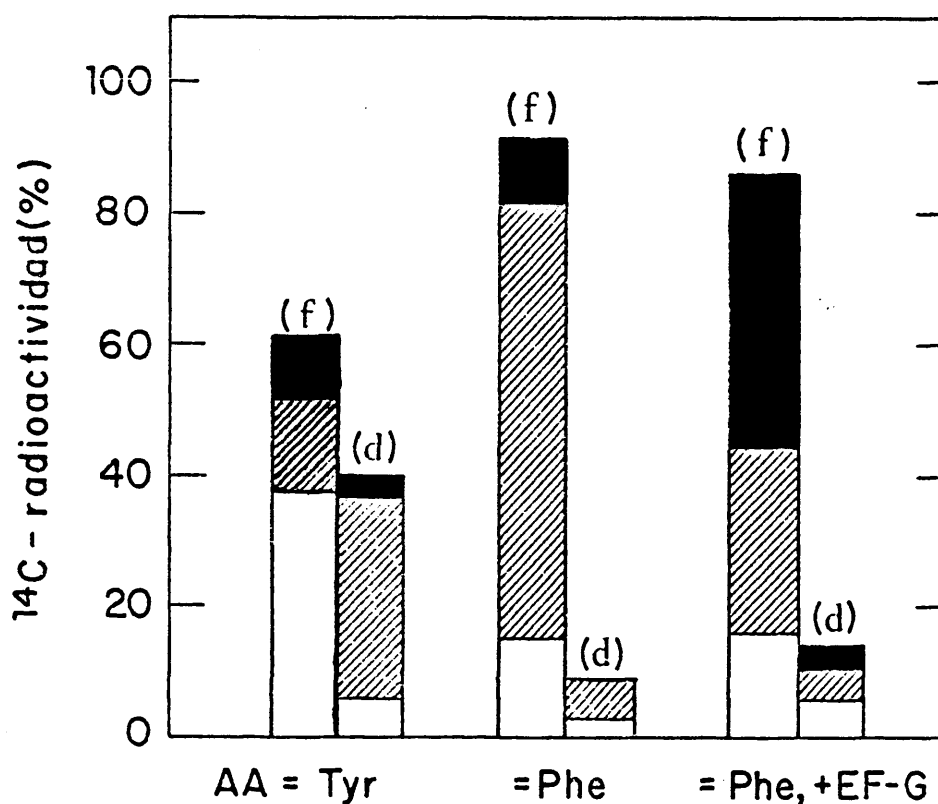


Figura 4.17.- $\text{Ac} [^{14}\text{C}] \text{Phe} - ([^3\text{H}] \text{aa})_{n \geq 0} - \text{tRNA}$ fijado (f) y desprendido (d) del ribosoma, después de la fijación de $[^3\text{H}] \text{Tyr} - \text{tRNA}^{\text{Tyr}}$ o $[^3\text{H}] \text{Phe} - \text{tRNA}^{\text{Phe}}$ al complejo $\text{Ac} [^{14}\text{C}] \text{Phe} - \text{tRNA} \cdot \text{ribosoma} \cdot \text{poli(U)}$. La fijación de $[^3\text{H}] \text{aa} - \text{tRNA}$ al complejo ribosómico en presencia de estreptomicina $6 \mu\text{M}$, y el análisis de los productos fijados y desprendidos del ribosoma, se realizaron como se describe en III.5. Después de fijar el $[^3\text{H}] \text{Phe} - \text{tRNA}^{\text{Phe}}$, se añadió una porción de $150 \mu\text{l}$ de esta mezcla, $30 \mu\text{g/ml}$ de EF-G y $0,1 \text{ mM}$ de GTP, continuando la incubación 5 min a 30°C . El 100% representa la suma de la radiactividad ^{14}C retenida en los filtros Millipore más la encontrada en los filtrados, $4280 - 4440 \text{ cpm}$, que supone el 97-100% de la radiactividad ^{14}C pre-

Figura 4.17.- (continuación).

sente en las mezclas de reacción. (■) $\text{Ac} [^{14}\text{C}] \text{Phe}-$
 $-([^3\text{H}] \text{aa})_{n \geq 1}$; (▨) $\text{Ac} [^{14}\text{C}] \text{Phe}- [^3\text{H}] \text{aa}$; (□) $\text{Ac} [^{14}\text{C}] \text{Phe}$.

el experimento control llevado a cabo con el $[^3\text{H}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$. En este caso más del 90% de la radiactividad ^{14}C permaneció unida a los ribosomas y consistía principalmente en $\text{Ac}[^{14}\text{C}]\text{Phe}-[^3\text{H}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$; de este dipéptido tan solo un 12% fué objeto de una posterior polimerización. Como era de esperar la polimerización del peptidil-tRNA codificado se logró al añadir el factor G al sistema (Figura 4.17). Debemos tener en cuenta que la proporción de oligopéptidos largos en este caso está subestimada, ya que como señalamos en el apartado III.5 la eficiencia de la extracción por NH_4OH del material fijado a los filtros es sensiblemente menor en el caso de estos oligopéptidos.

Los resultados presentados nos permiten concluir que la translocación espontánea y el desprendimiento del ribosoma, parecen ser características del peptidil-tRNA erroneamente codificado. Probablemente este ligando está retenido debilmente en el sitio A y se mueve con facilidad, bien sea al sitio P o al medio. La posibilidad de que nuestro sistema pudiera inducir de manera artefactual el desprendimiento de cualquier peptidil-tRNA durante la translocación, queda descartada al no observarse este desprendimiento del ribosoma en la translocación promovida por EF-G del peptidil-tRNA correctamente codificado (Figura 4.17).

IV.3.5. Efecto de la viomicina y otros antibióticos en el desprendimiento espontáneo y en la translocación no enzimática del peptidil-tRNA erroneamente codificado

Nuestro siguiente propósito fué estudiar el efecto de di-

versos antibióticos en las dos notables características del peptidil-tRNA erroneamente codificado (su liberación espontánea del ribosoma y la translocación no enzimática), esperando obtener datos que nos ayudaran a explicar los hechos observados.

Ensayamos en primer lugar el efecto de tres potentes inhibidores de la formación del enlace peptídico: la vernamicina A, la esparsomicina (Vázquez, 1979) y la higromicina A (M^a C. Guerrero, comunicación personal). En trabajos previos de nuestro laboratorio, se comprobó que ninguno de estos antibióticos impide la fijación del aminoacil-tRNA correctamente codificado al sitio A. Sin embargo, como se observa en la Tabla 4.XI todos ellos inhibieron significativamente la fijación de [³H] Tyr-tRNA^{Tyr}, y además impidieron el desprendimiento del material marcado con ¹⁴C del ribosoma.

Por último la Tabla 4.XI también muestra el efecto de la viomicina. Este antibiótico es un potente inhibidor de la translocación ribosómica e interfiere con este proceso impidiendo la salida del peptidil-tRNA del sitio A (Modolell y Vázquez, 1977). En nuestro ensayo la viomicina, como los inhibidores de la formación del enlace peptídico, inhibió fuertemente el desprendimiento del material marcado con ¹⁴C, pero a diferencia de ellos, este efecto iba acompañado de una estimulación de la fijación del tirosil-tRNA.

Seguidamente realizamos un estudio más detallado del efecto de estos antibióticos, analizando por electroforesis en papel los productos sintetizados al fijar el Tyr-tRNA^{Tyr} en presencia de la viomicina o la vernamicina A.

La Tabla 4.XII muestra que ambos antibióticos (tal como habíamos observado en el experimento anterior) impidieron eficiente-

Tabla 4.XI.- Efecto de varios antibióticos en la fijación de $[^3\text{H}]\text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ al complejo $\text{Ac}[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}\cdot\text{ribosoma}\cdot\text{poli(U)}$ y en el desprendimiento de los productos marcados con ^{14}C .

| Antibiótico añadido | Peptidil-tRNA desprendido | $[^3\text{H}]\text{Tyr-tRNA}$ fijado a ribosomas |
|------------------------|------------------------------|---|
| | % | |
| Ninguno | 42 | 100 |
| Vernamicina A | 12,9 | 43 |
| Higromicina A | 8,6 | 37 |
| Esparomicina | 0,7 | 60 |
| Viomicina | 0,0 | 186 |

La fijación se llevó a cabo en mezclas de $48\ \mu\text{l}$, en presencia de estreptomicina $6\ \mu\text{M}$ y del antibiótico indicado en la Tabla a la concentración de $10\ \mu\text{M}$. El peptidil-tRNA desprendido se midió por el decrecimiento de la radiactividad ^{14}C retenida en los filtros Millipore. El 100% representa 0,18 moléculas de material marcado con ^{14}C /ribosoma y 0,3 moléculas de $[^3\text{H}]\text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ fijado/ribosoma.

Tabla 4.XII.- Inhibición por vernamicina A y viomicina del desprendimiento del $\text{Ac } [^{14}\text{C}] \text{ Phe}-([^3\text{H}] \text{ Tyr})_{n \geq 1} \text{-tRNA}^{\text{Tyr}}$ de los ribosomas; composición del peptidil-tRNA fijado a ribosomas.

| Antibiótico | Peptidil-tRNA desprendido | Fijado a ribosomas | | |
|---------------|---------------------------|--------------------|----------------|------------------------------------|
| | | AcPhe-tRNA | AcPhe-Tyr-tRNA | AcPhe-(Tyr) _{n ≥ 1} -tRNA |
| | | % | | |
| Ninguno | 34 | 46 | 9 | 11 |
| Viomicina | 6 | 33 | 55 | 6 |
| Vernamicina A | 12 | 83 | 1 | 4 |

La fijación de $[^3\text{H}] \text{ Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ al complejo $\text{Ac } [^{14}\text{C}] \text{ Phe-tRNA}^{\text{Phe}} \cdot \text{ribosoma} \cdot \text{poli(U)}$ en presencia de estreptomicina $6 \mu\text{M}$ (y viomicina o vernamicina cuando se indica) se detalla en III.5. El peptidil-tRNA que permaneció en los filtros se extrajo y analizó como se indica en el método. El 100% representa 4570 cpm de radiactividad ^{14}C que equivale a 0,2 moléculas de peptidil-tRNA/ribosoma.

mente el desprendimiento del material marcado con ^{14}C , sin embargo esta protección se debió a distinta causa.

En efecto, la vernamicina A que en este experimento redujo la fijación del Tyr-tRNA^{Tyr} a un 61% del control sin antibiótico, inhibió casi por completo la formación del enlace peptídico entre el Tyr-tRNA^{Tyr} fijado en el sitio A y el AcPhe-tRNA^{Phe} situado en el P, ya que la mayor parte (el 94%) de la radiactividad ^{14}C fijada a los ribosomas, no estaba asociada a radiactividad ^3H . Este resultado indica que los antibióticos inhibidores de la peptidil-transferasa, impiden el desprendimiento del material marcado en ^{14}C del ribosoma, muy probablemente por inhibir la formación del Ac [^{14}C] Phe- [^3H] Tyr-tRNA^{Tyr} y no por estabilizar este ligando en el ribosoma.

En el caso de la viomicina, la Tabla 4.XII muestra que dicho antibiótico favoreció la acumulación del dipeptidil-tRNA erróneamente codificado en el ribosoma, pero a pesar de esta acumulación, apenas se sintetizaron tripéptidos y oligopéptidos de mayor longitud, indicando que la viomicina además del desprendimiento, inhibió la translocación no enzimática del AcPhe-Tyr-tRNA^{Tyr}.

IV.3.5.1. Polimerización promovida por EF-G del peptidil-tRNA erróneamente codificado, en presencia de la viomicina

Los datos obtenidos con la viomicina, nos hicieron pensar que quizás este antibiótico fortaleciera la interacción del dipeptidil-tRNA erróneo con el sitio A en un grado suficiente para bloquear el desprendimiento espontáneo y la translocación no enzimática (Tabla

4.XII), pero no lo bastante para impedir la translocación en presencia de EF-G y GTP.

Para comprobar esta suposición, estudiamos el efecto del antibiótico y de EF-G en la síntesis polipeptídica en el complejo AcPhe-tRNA.ribosoma.poli(U), promovida por $[^3\text{H}]\text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$. La Tabla 4.XIII, líneas 3 y 4, demuestra que nuestro razonamiento fué correcto. En presencia de la viomicina, la adición de EF-G al sistema estimula fuertemente la síntesis de tripéptidos y péptidos mayores. Del total de dipéptidos formados, tan solo un 8% sigue elongando en ausencia del factor, mientras que en su presencia lo hacen un 60% de los mismos. Sin embargo, en ausencia del antibiótico, la adición de G no modificó sustancialmente la polimerización no enzimática de las cadenas (líneas 1 y 2), tal como habíamos observado en el experimento de la Tabla 4.IX (línea 6).

La viomicina se había considerado hasta la fecha como un antibiótico que no interfería con el proceso de reconocimiento del aminoacil-tRNA, puesto que no parecía inducir errores en la lectura del mensajero en un sistema de síntesis polipeptídica dirigido por homopolinucleótidos sintéticos (Davies y cols., 1965; Tanaka e Igusa, 1968). Sin embargo, en experimentos preliminares, comprobamos que este antibiótico estimula por si solo la fijación de $[^3\text{H}]\text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ al complejo AcPhe-tRNA^{Phe}.ribosomas.poli(U). La viomicina resultó ser tan eficiente en la inducción de esta fijación errónea, como algunos antibióticos aminoglicosídicos y concretamente más eficiente que la estreptomycin (datos no mostrados).

Comprobada la estimulación de la fijación del Tyr-tRNA por la viomicina, examinamos el efecto del antibiótico en la polimeriza-

Tabla 4.XIII.- Efecto de la viomicina 10 μ M y el factor G 120 μ g/ml en la síntesis de oligopéptidos en el complejo Ac [14 C] Phe-tRNA^{Phe}.ribosoma.poli(U) promovida por [3 H] Tyr-tRNA^{Tyr}.

| Adiciones | % Ac [14 C] Phe-([3 H] Tyr) _n | | |
|------------------|---|------|------|
| | n=1 | =2 | >2 |
| Ninguna | 76,9 | 12,1 | 11 |
| EF-G | 67,7 | 21,0 | 11,3 |
| Viomicina | 92 | 5,5 | 2,5 |
| Viomicina + EF-G | 39 | 29 | 32 |

El experimento se realizó como se indica en Métodos (III.5) salvo que las mezclas de fijación de [3 H]Tyr-tRNA^{Tyr} contenían además de estreptomycin 6 μ M los componentes indicados en la Tabla. A los 10 min de incubación se sacaron porciones de 100 μ l de las mezclas y después de la hidrólisis alcalina a 37°C, se sometieron a electroforesis en papel como se describe en III.5. El 100% de actividad representa 2080-2540 cpm de radiactividad 14 C, recuperada en forma de oligopéptidos del papel electroforético.

Tabla 4.XIV.- Efecto de la viomicina y de EF-G en la síntesis polipeptídica en el complejo $\text{Ac } [^{14}\text{C}] \text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$.ribosoma.
 •poli(U) promovida por $[^3\text{H}] \text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ y $[^3\text{H}] \text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$.

| Adiciones a la mezcla | aa-tRNA utilizado | $\text{Ac } [^{14}\text{C}] \text{Phe-}([^3\text{H}] \text{aa})_n$ | | |
|--------------------------|---|--|----|----|
| | | n=1 | =2 | >3 |
| | | | % | |
| Viomicina | $[^3\text{H}] \text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ | 93 | 2 | 5 |
| Viomicina + EF-G | $[^3\text{H}] \text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ | 45 | 18 | 37 |
| Viomicina | $[^3\text{H}] \text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ | 97 | 1 | 2 |
| Viomicina + EF-G | $[^3\text{H}] \text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ | 69 | 19 | 12 |
| EF-G | $[^3\text{H}] \text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ | 40 | 11 | 49 |

El ensayo de fijación de $[^3\text{H}] \text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ o $[^3\text{H}] \text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ se realizó como en III.5, excepto que se omitió la estreptomycin de las mezclas de reacción. A los 10 min de incubación se sacaron porciones de 120 μl de las mezclas de fijación y se suplementaron con 30 $\mu\text{g/ml}$ de EF-G, continuando la incubación 10 min a 30°C. El resto del experimento se realizó de forma similar al de la Tabla 4.XIII. El 100% representa 1170-1580 cpm de radiactividad ^{14}C , recuperada como oligopéptidos del papel de electroforesis.

ción (promovida por EF-G) del $\text{Ac } [^{14}\text{C}] \text{Phe}-[^3\text{H}] \text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ en un experimento similar al de la Tabla 4.XIII pero omitiendo la estreptomicina de la mezcla de reacción. En esta ocasión se estudió en paralelo el comportamiento del peptidil-tRNA codificado, $\text{Ac } [^{14}\text{C}] \text{Phe}-[^3\text{H}] \text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$, en presencia de viomicina. Los resultados se muestran en la Tabla 4.XIV donde en las líneas 1 y 2 podemos apreciar que el factor G en presencia de la viomicina promueve la polimerización del dipeptidil-tRNA erróneamente codificado, de tal forma que el 5% de tetrapéptidos y péptidos mayores encontrados en ausencia de G, aumentaron hasta un 37% en su presencia.

En contraste, el factor en presencia de la viomicina indujo en mucha menor extensión la polimerización del dipeptidil-tRNA correctamente codificado (tan solo un 12% de tetrapéptidos y péptidos de mayor longitud, línea 4), tal como deberíamos esperar por la acción inhibidora del antibiótico en translocación. Consecuentemente, la omisión de la viomicina (línea 5) aumentó considerablemente la proporción de cadenas de cuatro o más residuos de fenilalanina.

Comparando las líneas 2, 4 y 5 de la Tabla 4.XIV, podemos concluir que la extensión de la polimerización observada con el $\text{Ac } [^{14}\text{C}] \text{Phe}-[^3\text{H}] \text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ en presencia de la viomicina y EF-G, fué parecida a la que se obtuvo con el $\text{Ac } [^{14}\text{C}] \text{Phe}-[^3\text{H}] \text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ y EF-G, pero sin el antibiótico (37% y 49% de cadenas de tamaño igual o superior a tetrapéptidos, respectivamente). Estos resultados sugieren que la viomicina aumenta la afinidad del dipeptidil-tRNA erróneo por el sitio ribosómico A, ocasionando que el comportamiento de este ligando en el ciclo de polimerización, se asemeje al del dipeptidil-tRNA correctamente codificado en ausencia del antibiótico.

IV.3.5.2. Efecto de la viomicina en la translocación del dipeptidil-tRNA correcta y erróneamente codificado

El efecto selectivo de la viomicina en la translocación del dipeptidil-tRNA, correcto y erróneo, se puso también de manifiesto al estudiar en presencia del antibiótico, la cinética de translocación dependiente de EF-G y GTP medida por la reacción de uno y otro ligando con la puromicina.

En la Figura 4.18 observamos que la translocación del $\text{Ac(Phe)}_2\text{-tRNA}^{\text{Phe}}$ fué inhibida energicamente por el antibiótico, especialmente a tiempos cortos de incubación. A tiempos más largos, una escasa translocación residual (la inhibición por el antibiótico no era del todo completa) movió el peptidil-tRNA al sitio P. Esta translocación residual podría explicar la ligera polimerización obtenida en el experimento de la Tabla 4.XIII, línea 3.

Por el contrario, la mayor parte del peptidil-tRNA erróneamente codificado, reaccionó rapidamente con la puromicina de tal forma que en los 2 primeros minutos de la reacción, la translocación fué un orden de magnitud superior a la del sustrato codificado. Las máximas cotas de $\text{AcPhe-Tyr-puromicina}$ se alcanzaron a los 4 min de incubación con dicho compuesto. Esta cinética de translocación resulta muy similar a la obtenida previamente en la translocación del AcPhe-tRNA en ausencia de antibióticos (Figura 4.6) y apoya una vez más la sugerencia sobre las semejanzas entre el comportamiento del peptidil-tRNA erróneamente codificado en presencia de la viomicina y del correctamente codificado, en ausencia del antibiótico.

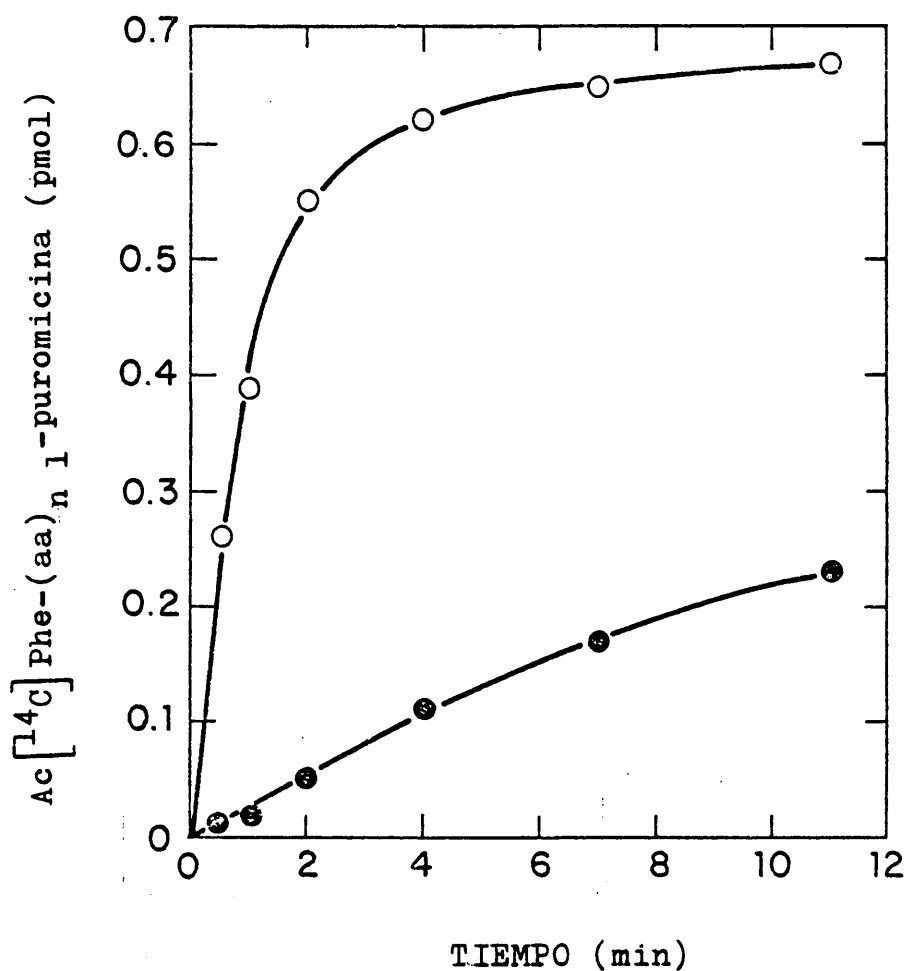


Figura 4.18.- Efecto de la viomicina en la translocación de Ac [¹⁴C] Phe-
- [³H] Tyr-tRNA^{Tyr} (O) y de Ac [¹⁴C] Phe- [³H] Phe-tRNA^{Phe} (●).
La fijación de [³H] aa-tRNA al complejo Ac [¹⁴C] Phe-tRNA·
·ribosoma·poli(U) se realizó como en III.5, en presencia
de viomicina 10 μM. Después de la fijación, las mezclas
de reacción (200 μl) se suplementaron con 25 μg de EF-G
y 0,45 mM de puromicina y se incubaron a 30°C. A los
tiempos indicados se determinó en alícuotas de 30 μl de
las mezclas, el peptidil-puromicina sintetizado por ex-
tracción a pH 5 en acetato de etilo. Al comienzo de la

Figura 4.18.- (continuación).

reacción con la puromicina, la radiactividad fijada a ribosomas en alícuotas de 30 μ l de cada mezcla fué: 0,76 y 0,93 pmol de productos marcados con ^{14}C , después de fijar Tyr-tRNA y Phe-tRNA respectivamente y 3,2 pmol de productos marcados con ^3H en ambos casos.

IV.3.6. Discusión

Hemos comprobado que en presencia de un antibiótico aminoglicosídico, ribosomas programados con poli(U) y con el sitio P ocupado con AcPhe-tRNA^{Phe}, pueden fijar un aminoacil-tRNA incorrectamente codificado como el Tyr-tRNA^{Tyr} (cuyo anticodón es GUA). Esta fijación, dependiente de EF-Tu y GTP, ocurre en el sitio ribosómico A y da lugar a la síntesis del AcPhe-Tyr-tRNA^{Tyr}. El dipeptidil-tRNA sintetizado, no permanece en el sitio aceptor después de la síntesis: más de un 60% se desprende del ribosoma y el 40% que permanece fijado se desplaza al sitio P, puesto que en ausencia de EF-G reacciona con el antibiótico puromicina. Por otro lado, una parte apreciable de los ribosomas que contienen AcPhe-Tyr-tRNA^{Tyr}, fijan posteriormente una o más moléculas de Tyr-tRNA^{Tyr} y sintetizan tripéptidos u oligopéptidos de mayor tamaño, indicando que en estos ribosomas el peptidil-tRNA erróneamente codificado transloca eficientemente del sitio A al P sin requerimiento del factor de polimerización G. La Figura 4.19, muestra esquemáticamente el comportamiento del peptidil-tRNA erróneamente codificado, según el modelo confeccionado a partir de los hechos experimentales observados.

Este comportamiento difiere de el del peptidil-tRNA codificado, Ac(Phe)₂-tRNA^{Phe}, sintetizado en una mezcla de reacción paralela, el cual permanece establemente fijado en el sitio A precisando del factor G para translocar al sitio P y para la subsiguiente polimerización con nuevas moléculas de Phe-tRNA^{Phe}. Este control, constituye la prueba más evidente de que la translocación no enzimática del peptidil-tRNA erróneo, no se debe a una contaminación de EF-G o a cual-

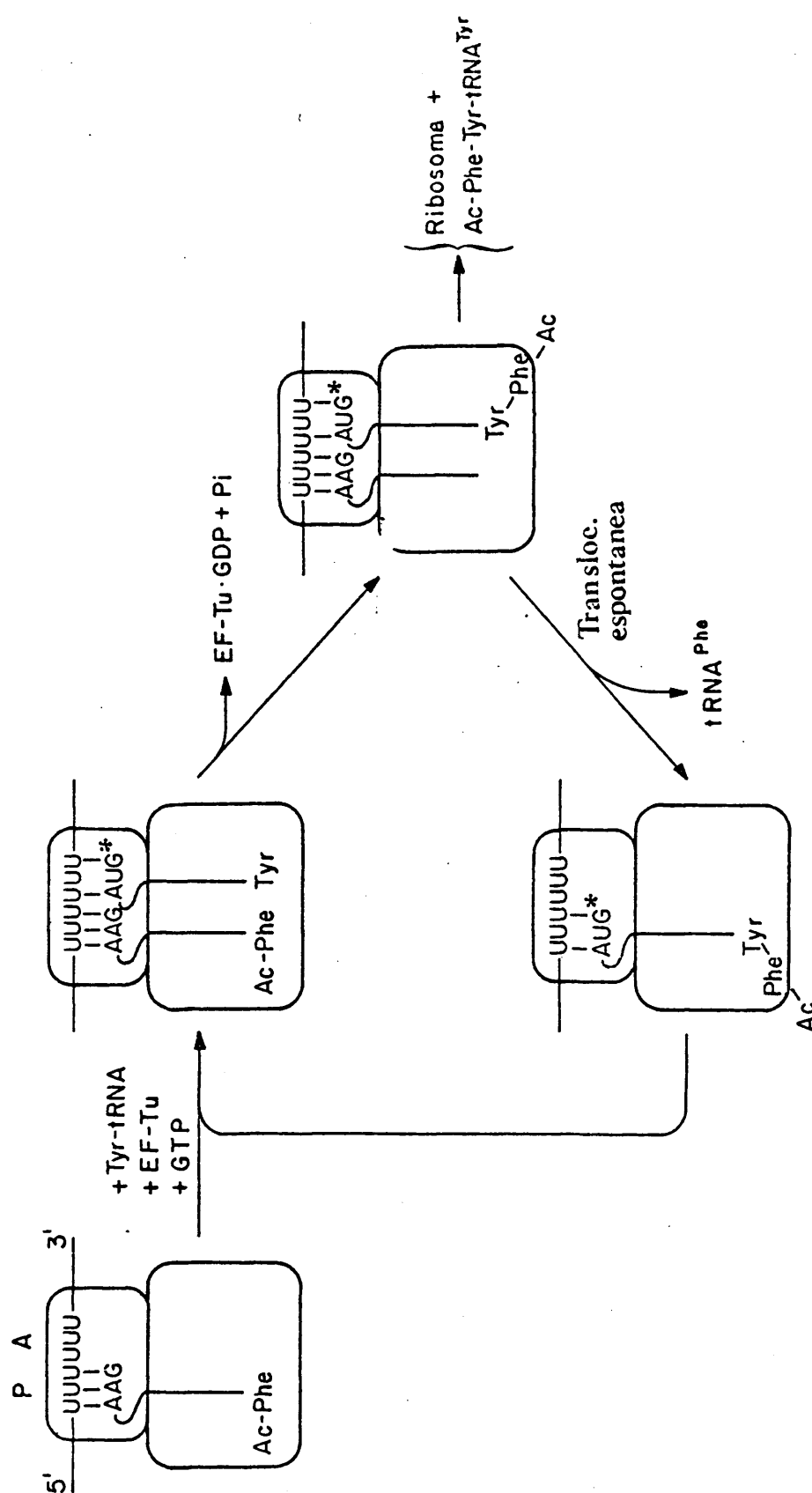


Figura 4.19.- Modelo de comportamiento del peptidil-tRNA erroneamente codificado deducido a partir de los hechos experimentales observados.

quier artefacto de nuestro sistema experimental.

Por el momento desconocemos si esta translocación no enzimática va asociada a un movimiento correcto del RNA mensajero y si transcurre por un mecanismo similar al de la translocación no enzimática del $(\text{Phe})_n\text{-tRNA}^{\text{Phe}}$ inducida por paracloromercuribenzoato, descrita por Gavrilova y Spirin (1971) y Pestka (1968).

Si como parece evidente, el $\text{AcPhe-Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ se retiene débilmente en el sitio A, su capacidad para translocar en ausencia de EF-G sugiere que el principal papel del factor en la translocación puede ser desestabilizar la fuerte fijación al sitio A del peptidil-tRNA codificado. Esta desestabilización, podía resultar de la competencia entre el EF-G y el peptidil-tRNA por una única área ribosómica (Modolell y Vazquez, 1975), o bien deberse a una modificación alostérica de la conformación del sitio A, promovida por la fijación de EF-G. Después de la desestabilización del peptidil-tRNA codificado, la alta afinidad de este ligando por el sitio P, facilitaría su translocación.

La débil fijación al sitio A del $\text{AcPhe-Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ contrasta con la del $\text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ que se fija fuertemente a este sitio ribosómico cuando el sitio P está libre u ocupado con tRNA^{Phe} desacilado (Campuzano y cols., 1979b). En principio, no encontramos razones para asumir que la interacción codón-anticodón sea más estable en un caso que en el otro. En consecuencia sugerimos que la distinta estabilidad de los dos ligandos en el sitio A, puede deberse a la interacción del $\text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ con la región ribosómica en contacto con el extremo 3' aminoacilado del tRNA, el centro peptidil-transferasa. La correcta interacción del $\text{Tyr-tRNA}^{\text{Tyr}}$ con esta región, parece ser esencial para la estabilidad de este ligando en el ribosoma, como lo demuestran va-

rios hechos observados. En efecto, los análogos no hidrolizables del GTP (GppCH₂p y GppNHp) son inefectivos en la fijación del Tyr-tRNA (datos no mostrados) posiblemente debido a que el aminoacil-tRNA fijado en presencia de estos análogos, tiene el extremo 3' terminal fuera del sitio aceptor de la peptidil-transferasa; por otra parte, la higromicina A, vernamicina A y esparsomicina, todos ellos inhibidores de la peptidil-transferasa que impiden la interacción de sustratos modelos con el sitio aceptor de la enzima y probablemente interfieren con la fijación del aminoacil-tRNA en este sitio, inhiben la fijación del Tyr-tRNA^{Tyr} pero no la del correctamente codificado, Phe-tRNA^{Phe}.

¿Cual es el significado fisiológico del desprendimiento del AcPhe-Tyr-tRNA^{Tyr} del ribosoma, observado in vitro? Se sabe desde hace algunos años, que el peptidil-tRNA ocasionalmente se disocia del ribosoma durante la síntesis de proteínas in vivo (Menninger, 1976). Además, durante el crecimiento en un medio carente de aminoácidos, aumenta diferencialmente la disociación de clases específicas de peptidil-tRNA (Caplan y Menninger, 1979). Estas observaciones han llevado a proponer un mecanismo ribosómico por el cual los peptidil-tRNAs erróneamente codificados son reconocidos, desprendidos del ribosoma y posteriormente degradados para impedir la terminación y acumulación de proteínas erróneamente traducidas.

El desprendimiento del peptidil-tRNA incorrectamente codificado observado por nosotros sugiere que tal mecanismo de corrección de errores en la traducción puede basarse en una disminución de la afinidad del sitio ribosómico A por los peptidil-tRNAs cuyas interacciones codón-anticodón sean erróneas.

Si las interacciones codón-anticodón correctas promueven

cambios conformacionales en la molécula de tRNA (Wagner y Garret, 1978) parece lógico pensar que las interacciones erróneas sean incapaces de inducir los cambios conformacionales necesarios para estabilizar la fijación del peptidil-tRNA erroneamente codificado en el sitio A, facilitando por consiguiente su desprendimiento.

Un futuro objeto de nuestro trabajo será averiguar si otros peptidil-tRNAs distintos a los que contienen tRNA^{Tyr} también se desprenden espontaneamente del ribosoma durante la síntesis polipeptídica "in vitro".

Hemos observado que la translocación no enzimática y el desprendimiento espontáneo del peptidil-tRNA erroneamente codificado, se inhiben por el antibiótico viomicina (un inhibidor de la translocación que impide la salida del peptidil-tRNA del sitio A (Modolell y Vazquez, 1977)). A diferencia de lo que ocurre con el peptidil-tRNA codificado, en presencia de la viomicina y EF-G, tiene lugar la translocación del AcPhe-Tyr-tRNA^{Tyr} y la polimerización de las cadenas peptídicas con Tyr-tRNA^{Tyr} como sustrato. La extensión de esta polimerización es comparable a la alcanzada con el peptidil-tRNA codificado y Phe-tRNA^{Phe} como sustrato, pero sin antibiótico. En adición a estos efectos, la viomicina induce la fijación del Tyr-tRNA^{Tyr} a ribosomas programados con poli(U) tan eficientemente como los antibióticos aminoglicosídicos ensayados.

Estos resultados sugieren que la interferencia de la viomicina con la síntesis de proteínas puede explicarse por un incremento de la afinidad del sitio A por el aminoacil-tRNA. Así, con el peptidil-tRNA codificado (que se fija establemente al sitio A) el refuerzo de la interacción conduce a la incapacidad para translocar al sitio

P en presencia de EF-G. Sin embargo, con el peptidil-tRNA erróneo (que se fija debilmente al sitio A) el incremento de la afinidad, estabiliza la fijación en menor medida, lo cual impide la translocación no enzimática y el desprendimiento espontáneo, pero permite la translocación de este ligando, promovida por EF-G.

El hecho de que la viomicina inhiba la fijación de f-met-tRNA a la subunidad 30S (Liou y Tanaka, 1976), es difícil de reconciliar con nuestra explicación, pero es posible que la inhibición de la iniciación y el incremento de la afinidad del sitio A puedan deberse a distintas interacciones del antibiótico con el ribosoma, ya que se ha descrito que la viomicina tiene al menos un sitio de fijación en cada subunidad del mismo (Misumi y cols., 1978).

C O N C L U S I O N E S

Hemos estudiado el efecto de la higromicina B y otros antibióticos aminoglicosídicos que inducen errores en la lectura del mensaje genético, en las distintas etapas del ciclo de polimerización de la síntesis protéica. Los resultados obtenidos nos han llevado a investigar el mecanismo por el cual un aminoacil-tRNA erroneamente codificado (Tyr-tRNA^{Tyr}) fijado a ribosomas programados con poli(U), se incorpora en una cadena protéica. Las principales conclusiones obtenidas han sido las siguientes:

1.- El antibiótico aminoglicosídico higromicina B inhibe la translocación, dependiente de EF-G y GTP, del AcPhe-tRNA y del peptidil-tRNA endógeno de E. coli, estudiada como una etapa aislada del ciclo de polimerización.

2.- La higromicina B, sin embargo, no afecta sustancialmente la cantidad de aminoacil-tRNA que se fija al sitio ribosómico A, ni la actividad peptidil-transferasa del ribosoma.

3.- Al añadir el antibiótico a un sistema in vitro que está sintetizando activamente polipéptidos, se inhibe inmediatamente la síntesis y el peptidil-tRNA queda retenido en el sitio aceptor. Consecuentemente, proponemos que la inhibición de la polimerización de la cadena peptídica por la higromicina B se debe, al menos en parte, al bloqueo de la translocación.

4.- En un sistema de síntesis polipeptídica dirigido por poli(U), la higromicina B inhibe la translocación y la síntesis e induce simultaneamente la incorporación de un aminoácido erroneamente codificado. Esta doble acción del antibiótico sugiere una relación entre los componentes ribosómicos implicados en el reconocimiento del

aminoacil-tRNA y en la translocación.

5.- A concentraciones fuertemente inhibidoras para la translocación, la higromicina B no interfiere con la interacción del EF-G con el ribosoma, ni bloquea el sitio ribosómico P, pero si inhibe drásticamente la síntesis no enzimática de polifenilalanina y el desprendimiento del AcPhe-tRNA del sitio aceptor del ribosoma. Estos resultados sugieren que el antibiótico interfiere con la translocación impidiendo la salida del peptidil-tRNA del sitio A. Este mecanismo de inhibición es muy similar al de la viomicina, un inhibidor de translocación, no relacionado estructuralmente con la higromicina B y que también induce errores en la selección del aminoacil-tRNA.

6.- Otros antibióticos aminoglicosídicos, inductores de errores en la lectura del mensajero, pertenecientes a los grupos de la neomicina, kanamicina y gentamicina, inhiben también la translocación enzimática del AcPhe-tRNA en un sistema purificado y la del peptidil-tRNA en un sistema de síntesis polipeptídica constituido por polisomas endógenos de E. coli.

7.- El grado de inhibición de la translocación varía con los diferentes antibióticos, observándose una buena correlación con la capacidad de cada uno para inhibir la polimerización de la cadena peptídica.

8.- En presencia de un antibiótico aminoglicosídico, ribosomas programados con poli(U) fijan el aminoacil-tRNA erróneamente codificado, Tyr-tRNA^{Tyr}. La fijación tiene lugar en el sitio ribosómico A, ya que el Tyr-tRNA^{Tyr} forma un enlace peptídico con el AcPhe-tRNA^{Phe} previamente fijado al sitio P.

9.- A diferencia del Ac(Phe)₂-tRNA^{Phe} (correctamente codi-

ficado) el AcPhe-Tyr-tRNA^{Tyr} no permanece en el sitio aceptor después de su síntesis, sino que se desprende espontáneamente del ribosoma o se desplaza al sitio donador sin requerir para ello el EF-G. Por tanto, el peptidil-tRNA erróneamente codificado se fija débilmente al sitio A.

10.- El AcPhe-Tyr-tRNA^{Tyr}, probablemente, se desprende del ribosoma como tal peptidil-tRNA, ya que es insoluble en ácido tricloroacético frío, pero es soluble en el mismo ácido a 90°C.

11.- El inhibidor de translocación viomicina, inhibe el desprendimiento espontáneo y la translocación no enzimática del peptidil-tRNA erróneamente codificado y, en consecuencia, estabiliza la fijación de este ligando en el sitio A.

12.- En presencia de EF-G, la viomicina inhibe la translocación del Ac(Phe)₂-tRNA, pero no la del AcPhe-Tyr-tRNA. Este último ligando polimeriza en presencia de viomicina y EF-G casi tan eficientemente como el peptidil-tRNA correctamente codificado, en ausencia del antibiótico.

13.- Estos resultados sugieren que los efectos de la viomicina en el ribosoma pueden explicarse por un incremento de la afinidad del sitio A por el tRNA acilado. Dicho incremento inhibe la translocación del peptidil-tRNA correctamente codificado y estabiliza la fijación del erróneamente codificado, aunque no lo suficiente para impedir su translocación.

14.- Nuestra observación de que el AcPhe-Tyr-tRNA se desprende de los ribosomas durante la síntesis de proteínas in vitro, aporta un mecanismo de corrección de errores en la traducción, basado en la disminución de la afinidad del sitio A por aquel peptidil-tRNA cuya interacción codón-anticodón no fuera la correcta.

B I B L I O G R A F I A

- ALEXANDER, D.C., JORDAN, D.C. y McKAGUE, M. (1969)
Can. J. Microbiol. 47, 1092.
- ARAI, K., KAWAKITA, M., KAZIRO, Y., KONDO, T. y UI, N. (1973)
J. Biochem. (Tokio) 73, 1095.
- BACA, O.G., ROHRBACH, M.S. y BODLEY, J.W. (1976)
Biochemistry 15, 4570.
- BENNE, R. y VOORMA, H.O. (1972)
FEBS Lett. 20, 347.
- BENVENISTE, R. y DAVIES, J. (1973)
Ant. Agents Chemother. 4, 402.
- BODLEY, J.W., ZIEVE, F.J., LIN, L. y ZIEVE, S.T. (1969)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 18, 557.
- BODLEY, J.W., ZIEVE, F.J., LIN, L. y ZIEVE, S.T. (1970a)
J. Biol. Chem. 245, 5656.
- BODLEY, J.W., ZIEVE, F.J. y LIN, L. (1970b)
J. Biol. Chem. 245, 5662.
- BRAY, G.A. (1960)
Anal. Biochem. 1, 279.
- BROT, N., SPEARS, C. y WEISSBACH, H. (1971)
Arch. Biochem. Biophys. 143, 286
- BUCKEL, P., BUCHBERGER, A., BOCK, A. y WITTMANN, H.G. (1977)
Molec. Gen. Genetics 158, 47.
- CABRER, B., SAN MILLAN, M.J., VAZQUEZ, D. y MODOLELL, J. (1976)
J. Biol. Chem. 251, 1718.

CAMMACK, K.A. y WADE, H.E. (1965)

Biochem. J. 96, 671.

CAMPUZANO, S., VAZQUEZ, D. y MODOLELL, J. (1979a)

Biochem. Biophys. Res. Commun. 87, 960

CAMPUZANO, S., CABAÑAS, M.J. y MODOLELL, J. (1979b)

Eur. J. Biochem. 100, 133.

CANNON, M., CABEZON, T. y BOLLEN, A. (1974)

Molec. Gen. Genetics 130, 321.

CAPLAN, A.B. y MENNINGER, J.R. (1979)

J. Mol. Biol. 134, 621.

CASKEY, C.T. (1977)

Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis (Eds., Weissbach, H. y Pestka, S.), pág. 443, Academic Press, New York (EE.UU.).

CONWAY, T.W. y SIPMANN, F. (1964)

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 52, 1462.

CHANG, F.N. y FLAKS, J.G. (1972)

Ant. Agents Chemother. 2, 308.

CHINALI, G., WOLF, H. y PARMEGGIANI, A. (1977)

Eur. J. Biochem. 75, 55-65.

CHRAMBACH, A. y RODBARD, D. (1971)

Science 172, 440.

CHUANG, D.M. y SIMPSON, M.V. (1971)

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 1474.

DAVIES, J.E., GILBERT, W. y GORINI, L. (1964)

Proc. Nat. Acad. Sci. 51, 883.

DAVIES, J., GORINI, L. y DAVIS, B.D. (1965)

Mol. Pharmacol. 1, 93-106.

DAVIES, J. (1966)

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31, 657.

DAVIES, J. y DAVIS, B.D. (1968)

J. Biol. Chem. 243, 3312-3316.

DAVIES, J. (1970)

Biochim. Biophys. Acta 222, 674.

ERBE, R.W., NAU, M.M. y LEDER, P. (1969)

J. Mol. Biol. 38, 441.

ERTEL, R., BROT, N., REDFIELD, B., ALLENDE, J.E. y WEISSBACH, H. (1968)

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 59, 861.

GARCIA-PATRONE, M., PERAZZOLO, C.A., BARALLE, F., GONZALEZ, N.S. y

ALGRANATI, T.D. (1971)

Biochem. Biophys. Acta 246, 291.

GAVRILOVA, L.P. y SPIRIN, A.S. (1971)

FEBS Lett. 17, 324.

GAVRILOVA, L.P., KOTELIANSKY, V.E. y SPIRIN, A.S. (1974)

FEBS Lett. 45, 324.

GAVRILOVA, L.P., KOSTIASHKINA, O.E., KOTELIANSKY, V.E.,

RUTKEVITCH, N.M. y SPIRIN, A.S. (1976)

J. Mol. Biol. 101, 537.

GIRBES, T., VAZQUEZ, D. y MODOLELL, J. (1976)

Eur. J. Biochem. 67, 257.

GIRBES, T., VAZQUEZ, D. y MODOLELL, J. (1977)

Eur. J. Biochem. 81, 473.

GIRBES, T., CABRER, B., MODOLELL, J. (1979)

Methods in Enzymology 59G, 353.

GLASBY, J.S. (1976)

Encyclopedia of Antibiotics, p.363. J. Wiley and Sons, London.

GLYNN, I.M. y CHAPPELL, J.B. (1964)

Biochem. J. 90, 147.

GODSON, N.G. y SINSHEINER, R.L. (1967)

Biochem. Biophys. Acta 149, 476.

GORDON, J. (1969)

J. Biol. Chem. 244, 5680.

GORINI, L. y KATAJA, E. (1965)

Biochem. Biophys. Res. Commun 18, 656.

GUPTA, S.L., WATERSON, J., SOPORI, M.L., WEISSMAN, M. y

LENGYEL, P. (1971)

Biochemistry 10, 4410.

HACHMANN, J., MILLER, D.L. y WEISSBACH, H. (1971)

Arch. Biochem. Biophys. 147, 457.

HAENNI, A.L. y CHAPEVILLE, F. (1966)

Biochem. Biophys. Acta 114, 135.

- HAENNI, A.L. y LUCAS-LENARD, J. (1968)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 61, 1363.
- HARRIS, R.J. y PESTKA, S. (1977)
Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis (Eds., Weissbach, H. y Pestka, S.), pág.413, Academic Press, New York (EE.UU.).
- HILL, W.E., ROSETTI, G.P. y VAN HOLDE, K.E. (1969)
J. Mol. Biol. 44, 263.
- HIRASHIMA, A. y KAJI, A. (1972)
Biochemistry 11, 437.
- IGARASHI, K., ISHITSUKA, H. y KAJI, A. (1969)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 499.
- INFANTE, A.A. y BAIERLEIN, R. (1971)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 1780.
- INOUE-YOKOSAWA, N., ISHIKAWA, C. y KAZIRO, Y. (1974)
J. Biol. Chem. 249, 4321.
- JACKSON, R.J. (1975)
MTP International Review of Science. Synthesis of Amino Acids and Proteins. Biochemistry 7 (Ed., Arnstein, H.R.V.), pág. 89, Butterworth, London (Inglaterra).
- KALOUSEK, F. y KONIGSBERG, W. (1975)
MTP International Review of Science. Synthesis of Amino Acids and Proteins. Biochemistry 7 (Ed., Arnstein, H.R.V.), pág. 57, Butterworth, London (Inglaterra).

KALTSCHMIDT, E. y WITTMANN, H.G. (1970)

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 1276.

KAZIRO, Y., INOUE-YOKOSAWA, N., KURIKI, Y., MIZUMATO, K., TANAKA, M.
y KAWAKITA, M. (1969)

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 385.

KAZIRO, Y., INOUE-YOKOSAWA, N. y KAWAKITA, M. (1972)

J. Biochem. (Tokio) 72, 853.

KOPPEL, D.E. (1974)

Biochemistry 13, 2712.

KUHBERGER, R., PIEPERSBERG, W., PETZET, A., BUCKEL, P. y
BOCK, A. (1979)

Biochemistry 18, 187.

KURIKI, Y. y KAJI, A. (1968)

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 61, 1399.

KURLAND, C.G. (1960)

J. Mol. Biol. 2, 83.

KURLAND, C.G. (1972)

Ann. Rev. Biochemistry 41, 377.

LAKE, J.A., SABATINI, D.D. y NONOMURA, Y. (1974)

"Ribosomes" (Eds., Nomura, M., Tissières, A. y Lengyel, P.), pág 543,
Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York (EE.UU.).

LANDO, D., COUSIN, M.A. y PRIVAT de GARILHE, M. (1973)

Biochemistry 12, 4528.

- LEDER, P. y BURSZTYN, H. (1966)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 25, 233.
- LEDER, P., SKOGERSON, L.E. y NAU, M.M. (1969)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 62, 454.
- LELONG, J.C., COUSIN, M.A., GROS, D., GRUNBERG-MANAGO, M. y
GROS, F. (1971)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 530.
- LELONG, J.C., GROS, D., GROS, F., BOLLEN, A., MASCHLER, R. y
STOFFLER, G. (1974)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 248.
- LENNOX, E.S. (1955)
Virology 1, 190.
- LIU, Y.F. y TANAKA, N. (1976)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 477.
- LOWRY, O.H., ROSSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J. (1951)
J. Biol. Chem. 193, 265.
- LUCAS-LENARD, J. y LIPMANN (1966)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 55, 1562.
- LUCAS-LENARD, J. y HAENNI, A.L. (1968)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 59, 554.
- LUCAS-LENARD, J. y HAENNI, A.L. (1969)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 63, 93.
- MADEN, B.E.H. y MONRO, R.E. (1968)
Eur. J. Biochem. 6, 309.

- MADEN, B.E.H., TRAUT, R.R. y MONRO, R.E. (1968)
J. Mol. Biol. 35, 333.
- MARTINEZ, O., VAZQUEZ, D. y MODOLELL, J. (1978)
FEBS Lett. 87, 21.
- MASUKAWA, H. y TANAKA, N. (1968)
J. Antibiotics 21, 73.
- MENNINGER, J. (1976)
J. Biol. Chem. 251, 3392.
- MILLER, D.L. y WEISSBACH, H. (1970a)
Arch. Biochem. Biophys. 141, 26.
- MILLER, D.L. y WEISSBACH, H. (1970b)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 1016.
- MILLER, D.L. y WEISSBACH, H. (1977)
Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis (Eds., Weissbach, H. y Pestka, S.), pág.324, Academic Press, New York (EE.UU.).
- MISUMI, M., TANAKA, N. y SHIBA, T. (1978)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 82, 971.
- MODOLELL, J. y DAVIS, B.D. (1969)
Nature 224, 345.
- MODOLELL, J. y DAVIS, B.D. (1970)
Proc, Nat. Acad. Sci. USA 67, 1148.
- MODOLELL, J., VAZQUEZ, D. y MONRO, R.E. (1971)
Nature New Biol. 230, 109.

MODOLELL, J. (1971)

Methods in Molecular Biology 1 (Eds., Last, J.A. y Laskin, A.I.),
pág. 1, Marcel Dekker Inc., New York (EE.UU.).

MODOLELL, J., GIRBES, T. y VAZQUEZ, D. (1975)

FEBS Lett. 60, 109.

MODOLELL, J. y VAZQUEZ, D. (1975)

MTP International Review of Science. Synthesis of Amino Acids and
Proteins. Biochemistry 7 (Ed., Arnstein, H.R.V.), pág.137,
Butterworth, London (Inglaterra).

MODOLELL, J. y VAZQUEZ, D. (1977)

Eur. J. Biochem. 81, 491.

MONRO, R.E. (1967)

J. Mol. Biol. 26, 147.

MONRO, R.E., MADEN, B.E.H. y TRAUT, R.R. (1967)

Symp. Fed. European Biochem. Soc. Genetics Elements: Properties and
Functions (Shugar, D., ed.) pág. 179, Academic Press, New York.

MORRIS, A. y SCHWEET, R. (1961)

Biochem. Biophys. Acta 47, 415.

NAAKTGEBOREN, N. (1976)

Tesis Doctoral, Universidad de Leiden (Holanda).

NATHANS, D. (1964)

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 51, 585.

NEUSS, N., KOCH, K.F., MOLLOY, B.B., DAY, W., HUCKSTEP, L.L.,

DORMAN, D.E. y ROBERTS, J.D. (1970)

Helv. Chim. Acta 53, 2314.

- NIRENBERG, M.W. y MATTHAEI, J.H. (1961)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 47, 1588.
- NIRENBERG, M. y LEDER, P. (1964)
Science, 145, 1399.
- NISHIZUKA, Y. y LIPMANN, F. (1966a)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 55, 212.
- NISHIZUKA, Y. y LIPMANN, F. (1966b)
Arch. Biochem. Biophys. 116, 344.
- OFENGAND, J. (1977)
Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis (Eds., Weissbach, H. y Pestka, S.), pág. 8, Academic Press, New York (EE.UU.).
- ONO, Y., SKOULTCHI, A., WATERSON, J. y LENGUEL, P. (1969)
Nature 222, 645.
- OSTERBERG, R., SJOBERG, B., PETTERSSON, I., LILJAS, A. y KURLAND, C.G. (1977)
FEBS Lett. 73, 22.
- PARMEGGIANI, A. y GOTTSCHALK, E.M. (1969)
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 377.
- PARMEGGIANI, A., SINGER, C. y GOTTSCHALK, E.M. (1971)
Methods. Enzymol 20C, 291.
- PESTKA, S. (1968)
J. Biol. Chem. 243, 2810.
- PESTKA, S. (1971)
Ann. Rev. Microbiol. 25 , 487.

PESTKA, S. (1972a)

J. Biol. Chem. 69, 624.

PESTKA, S. (1972b)

J. Biol. Chem. 247, 4669.

PESTKA, S. (1977)

Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis (Eds., Weissbach, H. y Pestka, S.), pág.467, Academic Press, New York (EE.UU.).

PETTERSON, I., HARDY, S.J.S. y LILJAS, A. (1976)

FEBS Lett. 64, 135.

RABINOVITZ, M. y FISHER, J.M. (1962)

J. Biol. Chem. 237, 477.

RAVEL, J.M. (1967)

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 57, 1811.

REVEL, M. (1977)

Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis (Eds., Weissbach, H. y Pestka, S.), pág. 246, Academic Press, New York (EE.UU.).

ROBERTS, R.B., ABELSON, P.H., COWIE, D.E., BOLTON, E.T. y BRITTEN, R.J. (1955)

Studies of Biochemistry in E. coli 607, pág. 420. Carnegie Inst. Wash. Publ.

ROSSET, R., MONIER, R. y JULIEN, J. (1964)

Bull. Soc. Chem. Biol. 46, 87.

SCOLNICK, E., TOMPKINS, R., CASKEY, T. y NIRENBERG, M. (1968)

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 61, 768.

SCHREINER, G.y NIERHAUS, K.H.(1973)

J. Mol. Biol. 81, 71.

SCHRIER, M.H. y NOLL, H. (1971)

Proc. Nat. Acad. Sci USA 68, 805.

SHOREY, R.L., RAVEL, J.M., GARNER, C.W. y SHIRE, W. (1969)

J. Biol. Chem. 244, 4555.

SKOULTCHI, A., ONO, Y., WATERSON, J. y LENGYEL, P. (1970)

Biochemistry 9, 508.

STOFFLER, G. y WITTMANN, H.G. (1977)

Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis (Eds., Weissbach, H. y Pestka, S.), pág. 117, Academic Press, New York (EE.UU.).

SUZUKI, J., KUNIMOTO, T. y HORI, M. (1970)

J. Antibiotics 23, 99.

TAI, P.C., WALLACE, B.J., HERZOG, E.L. y DAVIS, B.D. (1973)

Biochemistry 12, 609.

TAI, P.C., WALLACE, B.J. y DAVIS, B.D. (1978)

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 275.

TAI, P.C. y DAVIS, B.D. (1979)

Biochemistry 18, 193.

TANAKA, N., MASUKAWA, H. y UMEZAWA, H. (1967)

Biochem. Biophys. Res. Commun. 26, 544.

TANAKA, N., KINOSHITA, T. y MASUKAWA, H. (1968)

Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 278.

TANAKA, N. e IGUSA, S. (1968)

J. Antibiotics 21, 239.

THACH, S.A. y THACH, R.E. (1971)

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 1791.

TISSIERES, A., WATSON, J.D., SCHLESSINGER, D. y HOLLINGWORTH, B.R.
(1959)

J. Mol. Biol. 1, 221.

TRAUT, R.R. y MONRO, R.E. (1964)

J. Mol. Biol. 10, 63.

UMEZAWA, S. (1975)

Drug Action and Drug Resistance in Bacteric (Ed., S. Milshuashi),
pág. 3, University of Tokio Press, Japon.

VAZQUEZ, D. (1978)

Aminoacid and Protein Biosynthesis II. International Review, Univer-
sity Park Press. Baltimore. Vol 18 (H.R.V. Arnstein, ed.).

VAZQUEZ, D. (1979)

Inhibitors of Protein Biosynthesis, Springer-Verlag, Heillelberg (Ale-
mania).

WAGNER, R. y GARRET, R.A. (1978)

FEBS Lett. 85, 291.

WALLACE, B.J., TAI, P.C., HERZOG, E.L. y DAVIS, B.D. (1973)

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 1234.

WATANABE, S. (1972)

J. Mol. Biol. 67, 443.